

Tartu Ülikool
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Ökoloogia- ja maateaduste instituut
Geograafia osakond

Christof Uisk

Naftareostuse mõju rannikule ja ranniku puhastamise meetodid

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogia erialal
12 EAP

Juhendaja: prof Jaak Truu

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

Osakonna juhataja:

Tartu 2018

Infoleht

Naftareostuse mõju rannikule ja ranniku puhastamise meetodid

Selle bakalaureusetöö eesmärk oli uurida antropogeense naftareostuse poolt põhjustatud mõju rannikule ning erinevaid füüsikalisi, keemilisi ja bioloogilisi meetodeid, mida kasutatakse reostunud ranniku puhastamiseks. Kirjanduse ülevaate osas analüüsitakse reostuse mõju rannikuelustikule ja kirjeldatakse puhastusmeetodite efektiivsust. Töö eksperimentaalse osa eesmärk on võrrelda kahe DNA eraldamise meetodi sobilikkust laevakütusega saastunud pinnasest DNA eraldamiseks. PowerBiofilm kit'i kasutamine andis kõrgema DNA kontsentratsiooni, 16S rRNA geeni amplifikatsiooni efektiivsuse ja bakteri 16S rRNA geeni arvukuse.

Märksõnad: naftareostus, biolagunemine, DNA eraldamine, PowerSoil, PowerBiofilm
T270 – Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

Abstract

Impacts of oil spills on shorelines and cleanup methods

The aim of this study was to give a comprehensive overview of the environmental impacts of oil spills on shorelines. The literature review focuses on the impact of oil on shoreline flora and fauna and discusses the advantages and disadvantages of common physical, chemical and biological methods of treating oil polluted environments. Successful implementation of bioremediation techniques depends on temperature, oil concentration and the availability of nutrients and oxygen. The experimental part compared two commercial DNA extraction kits for extracting DNA from oil-contaminated soil samples and the PowerBiofilm method showed several advantages over the PowerSoil Isolation Kit.

Keywords: *oil spills, biodegradation, DNA extraction, PowerSoil PowerBiofilm.*

T270 – *Environmental technology, pollution control.*

SISUKORD

SISUKORD	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 NAFTAREOSTUS	6
1.1.1 NAFTAREOSTUSE ALLIKAD MERES	10
1.1.2 NAFTAREOSTUSE LEVIK JA MÕJU RANNIKULE	12
1.1.3 REOSTUSE ÖKOLOOGILINE MÕJU	15
Rannikutaimesed ja selgrootud.....	15
Kalad ja muud selgroogsed	16
1.1.4 RANNIKULE JÕUDNUD NAFTAREOSTUSE LIKVIDEERIMISE MEETODID	17
Füüsilised meetodid naftareostuse eemaldamiseks	17
Keemilised meetodid naftareostuse eemaldamiseks	20
1.2 NAFTASAADUSTE BIOLAGUNEMINE RANNAS	21
Seiratav looduslik tervenemine	23
Biostimulatsioon	24
Bioaugmentatsioon.....	25
2. MATERJAL JA METOODIKA	27
2.1 KATSE KIRJELDUS	27
2.2 DNA ERALDAMINE JA KVANTIFITSEERIMINE	27
2.3 BAKTERITE 16S rRNA GEENI KVANTIFITSEERIMINE	28
2.4 ANDMETE ANALÜÜS.....	29
3. TULEMUSED	30
3.1 DNA KONTSENTRATSIOONIDE ERINEVUSED	30
3.2 BAKTERI 16S rRNA AMPLIFIKATSIOONI EFEKTIIVSUS	31
3.3 BAKTERITE 16S rRNA GEENI ARVUKUS.....	32
KOKKUVÕTE	34
KASUTATUD KIRJANDUS	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	39
LISAD	40
Lisa 1. Meilivahetus minu ja Soome Keskkonnainstituudi reostusele reageerimise osakonna juhi, Jorma Rytönen'i vahel, kus on kirjas minu küsimused ja tema vastused (tõlgitud inglise keelest) (28.03.2018).	40
Lisa 2. Katsetes mõõdetud parameetrid koos standardhälvetega	40
LIHTLITSENTS	41

SISSEJUHATUS

Fossiilkütuste kasutamine on lahutamatu osa kaasaegsest ühiskonnast. Me kasutame neid energia saamiseks ning transpordivahendite liikvel hoidmiseks. Toorainete kogumise ja töötlemise tehnoloogia on küll aastatega muutunud efektiivsemaks, aga õnnetusi ei suudeta veel täielikult vältida. Eestis on suur osa pinnasereostusest seotud Nõukogude Liidu sõjaväe tegevusega, kuid maailma mastaabis on suurim probleem rannikualade ja merevee saastumine naftasaadustega. Iga-aastaselt tarbitakse ülemaailmselt ~ 84 miljonit barrelit toornaftat, millest pea 50% transporditakse odava hinna ja mahutavuse tõttu mereteedel (Statista, 2018). Kuigi ajalooliselt on strateegilise tähtsusega olnud Hormuzi väin ja Panama kanal, siis arktilise jäämassi kahanemine on viinud lühemate kaubateede tekkeni. Üheks paljulubavaks mereteeks on hetkel kasutatavast Suessi marsruudist oluliselt lühem Põhjamere marsruut. Lisaks kaubandusele suureneb mereteede kasutus ka turisminduse ning nafta ja maagaasi puurimise eesmärkidel. Arktiline kliima mõjutab lisaks raskesti ligipääsetava keskkonna ja vee erinevate füüsikaliste ning keemiliste omaduste tõttu naftareostuse saatust, raskendades likvideerimist. Majanduslike kaalutluste tõttu ei saa kõikide saastunud aladega aktiivselt tegeleda ning tihti peale jäetakse need biolagunemise hoolde. Biolagunemine on aga külmas kliimas aeglustunud ning selle meetodi rakendamise edukus sõltub süsivesinike biosaadavusest ning teiste toitainete olemasolust.

Töö eesmärk on anda ülevaade naftareostuse mõjust rannikule ja meetoditest, kuidas randa jõudnud naftareostust eemaldada. Eksperimentaalse osa eesmärk on võrrelda kahe kommertsiaalse DNA eraldamise meetodi sobilikkust laevakütusega saastunud pinnasest DNA eraldamiseks.

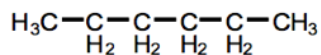
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 NAFTAREOSTUS

Naftareostuse all peetakse silmas naftasaaduste, ehk naftast ja naftagaasidest saadud gaasiliste, vedelate ja tahkete süsivesinike või nende segude lekkimist keskkonda inimtegevuse tagajärjel (Kriipsalu jt, 2016). Tegemist on globaalse probleemiga, mis mõjutab kõiki maismaa ning veekogude ökosüsteeme ja nende toimimist. Naftasaadused on peamiselt süsivesinike ühendid, mis koosnevad vesinikust ja süsinikust ning saadakse nafta destilleerimisel. Nad varieeruvad oma molekulmassi, füüsikaliste ja keemiliste omaduste poolest. Näiteks toornafta koosneb 97% ulatuses süsinikust ja vesinikust, ning ülejäänud 3% on lämmastik, väävel ja hapnik (National Research Council, 2003). Kirjanduses klassifitseeritakse erinevaid naftasaaduseid vastavalt nende keemilisele struktuurile - nt küllastunud, aromaatsed ja polaarsed (joonis 1). Küllastunud ühendid koosnevad peamiselt vesiniku molekuliga küllastunud süsinikest ehk alkaanidest. Aromaatsed ühendid on vähemalt ühe benseenituumaga väga stabiilsed ja püsivad ühendid, millel võib olla organismidele toksiline mõju (National Research Council, 2003). Polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (PAH) koosnevad mitmest ühendunud benseenituumast ja neil on toornafta koostistest keskkonnale kõige kahjulikum mõju (Venosa ja Zhu, 2003). Polaarseid ühendeid (vaigud ja asfalteenid) on keemiline side elementidega nagu väävel, lämmastik ja hapnik ning nad omavad seetõttu tugevat elektrilist laengut. Polaarsete suurem rühm, asfalteenid, on väga suured molekulid ja neil võib olla tugev mõju nafta käitumise üle keskkonnas (National Research Council, 2003).

Märtsis toimunud Soome Keskkonnainstituudi (SYKE) poolt organiseeritud arktilise naftareostuse konverentsis mul osaleda polnud võimalik, kuid mul õnnestus reostusele reageerimise osakonnajuhil, Jorma Rytönen'i käest saada mõned kommentaarid antud teema kohta (meilivahetus on lisas 1). Ta leidis, et järgmise 10 aasta jooksul naftareostuse tekkimise oht Arktikas suureneb ja keskkonnariski vähendamiseks tuleks rahvusvahelist koostööd edendada. Konverentsi raames toimunud harjutused näitasid, et treenitud meeskondade ja pädeva infotehnoloogilise võrgustikuga, mis annab reaajas infot laevaliikluse kohta, on võimalik katastroofilisi õnnetusi vältida.

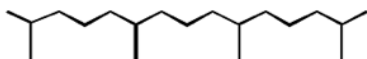
KÜLLASTUNUD



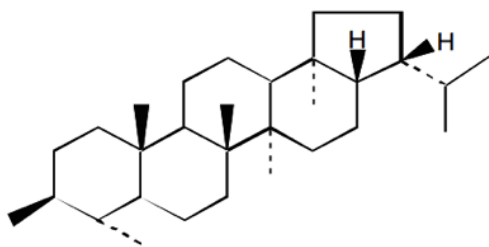
n-heksaan



n-heptadekaan(n-C₁₇H₃₆)



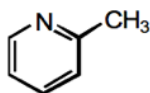
pristaan(C₁₉H₄₀)



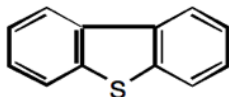
17α(H),21β(H)-hopaan

VAIGUD

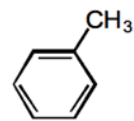
2-metüülpüridiin



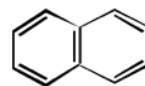
dibenso-tiofeen



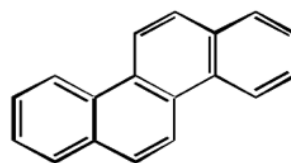
AROMAATSED



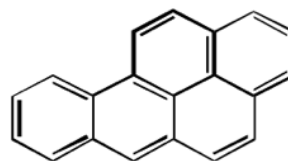
tolueen



naftaleen

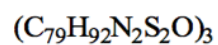


krüseen



benso[a]püreen

ASFALTEENID

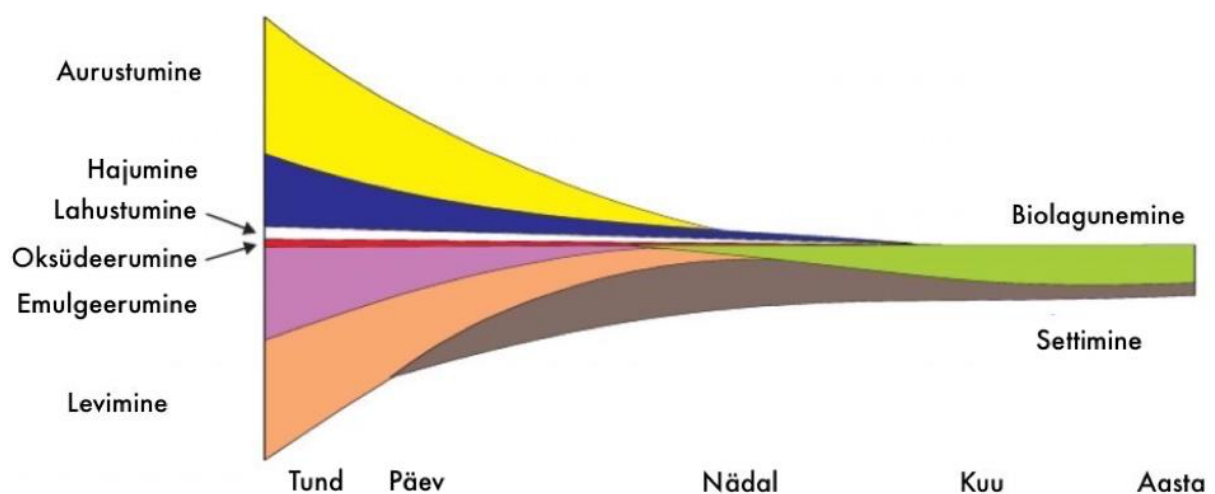


Joonis 1. Toornaftas leiduvad orgaanilised ühendid (Zhu *et al.*, 2001).

Nafta leviku ja keskkonnakahju mõttes on kõige olulisemad omadused vedela nafta tihedus, viskoossus ja lahustuvus. Tihedus väljendab mingi kindla toornafta ruumalaühiku massi, ning seda tähistatakse grammi kuupsentimeetri kohta (g/cm³). Seda kasutatakse kergete (<0.83 g/cm³) ja raskete (>0.86 g/cm³) naftasaaduste eristamiseks (Hazen *et al.*, 2015). Lisaks defineerimisele on tihedusel oluline roll keskkonnas, kuna see näitab, kas mingi naftasaadus

jääb merepinnale ujuma või vajub põhja. Kuna merevee keskmine tihedus on 1.03 g/cm^3 , siis jäävad pea kõik naftaproduktid veepinnale (National Research Council, 2003). Viskoossus iseloomustab vedeliku voolavust - suurema viskoossusega naftasaadus voolab aeglaselt (nt toornafta) ja väiksema viskoossusega naftasaadus kiiresti (nt autobensiin). Saaduse viskoossuse määrab ära raskete ning kergete ühendite suhe naftasaaduses - mida rohkem kergete komponente (nt asfalteenid), seda madalam viskoossus. Lagunemise mõttes on see oluline, kuna viskoossemad saadused ei levi nii õhukesteks õlilaikudeks, vaid moodustavad tõrvapalle, mis murenevad väga aeglaselt ja jäävad keskkonda püsima (National Research Council, 2003). Lahustuvus näitab kui suur osakaal naftasaadusest molekulaarsel tasandil vees lahustub. Kuigi lahustuv kogus on suhteliselt väike võrreldes teiste laguprotsessidega nagu aurustumine, on tegemist ikkagi olulise nähtusega, kuna toornaftas leiduvad lahustuvad ühendid (nt benseen) on elustikule toksilised (Zhu *et al.*, 2001).

Merekeskkonda jõudes hakkab naftasaadustega toimuma rida füüsikalisi ja keemilisi muutusi, mida kokkuvõtvalt nimetatakse murenemiseks (ing. k. *weathering*). Need protsessid toimuvad kõik erineva kiirusega ja pea kõik hakkavad koheselt mõjuma saaduse struktuurile. Murenemise kiirus ja tüüp sõltub naftasaadusest ning keskkonnatingimustest. Temperatuuri langedes murenemise protsessid aeglustuvad ning võivad olla täiesti ebaolulised 0°C juures (National Research Council 2003). Kuigi iga õnnetus on unikaalne oma toimumiskoha poolest ja seetõttu ei saa alati kindlalt öelda, mis protsessid naftareostust mõjutavad, annab joonis 2 üldise pildi naftasaaduste struktuuri muutvatest protsessidest.



Joonis 2. Füüsikalis-keemiliste protsesside muutlikkus ajas (ITOPF, 2014).

Naftasaaduste levimine merepinnal algab pihta koheselt (joonis 2), moodustades suuri laiike (ing. k. *oil slicks*), mis meenutavad õhukesi naftakilesid. Levimine on oluline protsess, sest see suurendab reostuse kogupindala, soodustades massiülekannet läbi aurustumise ja hajumise (Zhu *et al.*, 2001). Laikude levimise kiirus sõltub gravitatsioonist, inertsist, hõõrdumisest ja õli viskoossusest – voolavad, madala tihedusega õlid levivad kiiremini kui kõrge tihedusega õlid. Arktilisele kliimale omastel temperatuuridel kipuvad õlid olema viskoossemad, seega on nende levik avamerel aeglustunud. Reostuse likvideerimise avamerel teeb keerulisemaks see, et õlilaigud on korrapäratu suuruse ja kujuga ning ka ühe laigu sees esineb erinevusi õlikihi paksuses (ITOPF, 2014a).

Samaaegselt levimisega hakkavad naftasaaduste kergemad komponendid aurustuma. Keskkonnamõjude vähendamise mõttes on aurustumine üks tähtsamaid esimesi protsesse – sõltuvalt naftasaaduse keemilisest koostisest võib kuni 50% toksilisemaid ja kergemaid ühendeid aurustuda esimese 12 tunni jooksul (Zhu *et al.*, 2001). Aurustumise kiirus ja aurustuva materjali kogus sõltub ühendi molekulmassist. Kergemad naftasaadused (nt autobensiin) aurustuvad täielikult mõne päevaga, kuid raskematel õlidel toimub see aeglasemalt, sest lenduvate ühendite osakaal on neis väiksem (Venosa ja Zhu, 2003). Suurte õlilaikude intensiivset aurustumist põhjustavad eelkõige tugevad tuuled, lainetus ja kõrged temperatuurid (National Research Council, 2003).

Naftasaaduste hajumine tähendab õlilaikude lagunemist väiksemateks õlitilkadeks, mis veesambasse hajuvad. Tegemist on suhteliselt ebastabiilsete moodustistega, seega on vaja pidevat lainetust ja turbulentsi, et need ei ühineks pinnapealseteks laikudeks (ITOPF, 2014a). Õlitilkade moodustumine võib kiirendada biolagunemise kiirust, sest neil on suurem eripind võrreldes õlilaikudega ja seega rohkem pinda, kuhu saavad kinnituda mikroorganismid või kus saab toimuda lahustumine (Zhu *et al.*, 2001).

Emulgeerumine on protsess, kus merevee tilgad satuvad naftasaaduste sisse, moodustades vesi-õlis-emulsiooni. Stabiilsed emulsioonid koosnevad kuni 85% ulatuses veest, suurendades algset reostuse ruumala 3-5 kordselt (National Research Council, 2003). Emulsioonid mõjutavad reoaine füüsikalisi omadusi, eelkõige viskoossust ja võivad muuta kerge ning vedela õli pooltahkeks materjaliks. Taolised moodustised on vastupidavamad laguprotsessidele, raskendavad reostuse mehaanilist eemaldamist ning põhjustavad selle pikaajalise püsimise meres (Venosa ja Zhu, 2003).

Kuigi massikao mõttes pole naftasaaduste lahustumine naftalekke puhul oluline, võivad lahustunud süsivesinikud potentsiaalselt olla ökosüsteemidele toksilised ja mõjutada biolagunemise efektiivsust (Zhu *et al.*, 2001). Lahustumise kogus sõltub ühendi lahustuvusest, ilmatingimustest ja õnnetuspaiga eripäradest. Kõige paremini lahustuvad madalmolekulaarsed ühendid nagu benseen ja toluen, mis küll aurustuvad kiiresti kuid oma toksilisuse tõttu on keskkonnale ohtlikud (ITOPF, 2014a).

Väiksemal määral leiab aset naftasaaduste ühendite oksüdeerumine, mis muudab süsivesinike struktuure ja tekitab uusi ühendeid. Kui varuda piisavalt aega ja hapnikku, lagunevad kõik orgaanilised ühendid süsinikuks ja veeks. Naftasaaduse oksüdeerumisel tekivad alkoholid, ketoonid ja orgaanilised happed - ühendid, millel on suurem lahustuvus võrreldes algsete ühenditega (National Research Council, 2003). Oksüdeerumine saab toimuda, kas valguse (fotoooksüdatsioon) või mikroobide mõjul, vastavalt sellele, kust tuleb energia oksüdatsiooniprotsesside jaoks (Venosa ja Zhu, 2003).

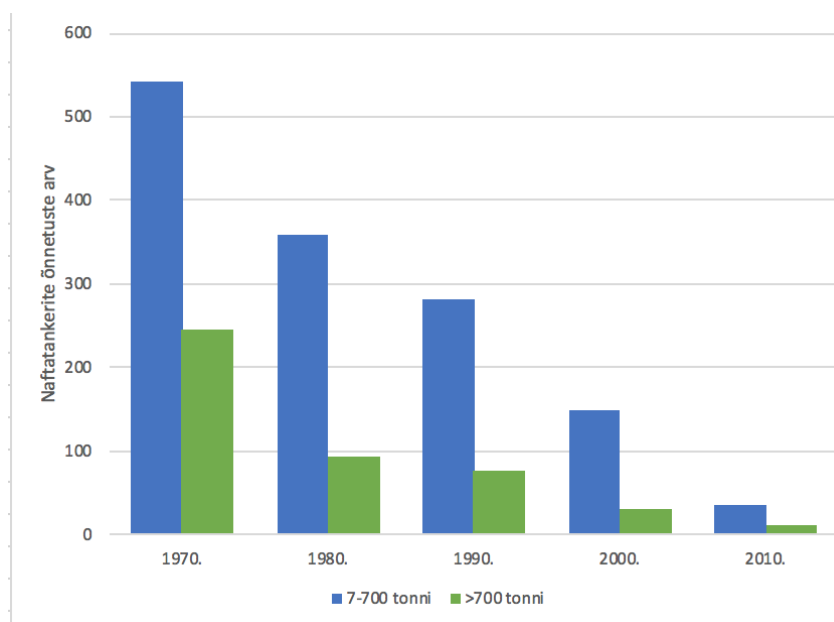
Naftasaaduste settimine on harv nähtus ning saab toimuda vaid väheste naftasaadustega. Settida võivad väga rasked ($>0.86 \text{ g/cm}^3$) saadused või siis kergemad õlid, mis kinnituvad teiste osakeste külge (ITOPF, 2014a).

1.1.1 NAFTAREOSTUSE ALLIKAD MERES

Tavainimene võib üllatuda kuuldes, et toornafta on juba miljoneid aastaid olnud osa merekeskkonnast ning seda on bioloogia algusest saati kasutanud energia- ja süsinikuallikana mikroobid troopikast Arktikani välja (Hazen *et al.*, 2015). Suurim nafta sisend merekeskkondadesse toimub imbumise kaudu, mis moodustab 60% Põhja-Ameerika vetesse sattunud naftakogusest (National Research Council, 2016). Toornafta imbumine toimub läbi merepõhja all olevate geoloogiliste moodustiste, seega tegemist on täiesti loodusliku fenomeniga. Vaatamata suurele naftakogusele ei ole need protsessid kahjulikud, sest nafta lekkimine toimub väga aeglaselt, mistõttu on ümbritsev ökosüsteem sellega kohanenud ja hakanud toitainete külluses õitsema (National Research Council, 2016).

Kõige rohkem meediakajastust saavad naftatankerite ja –puurtornide õnnetused, mis paiskavad lühikese aja jooksul keskkonda suurtes kogustes naftat. *International Tanker Owners Pollution*

Federation statistika (joonis 3) näitab, et laevaõnnetuste tagajärjel keskkonda lekkinud nafta kogus on järjest vähenenud. Et nii tankerite mahutavus kui ka nõudlus naftasaaduste järele on suurenenud, on üllatav, et vähenenud on nii õnnetuste hulk kui ka keskkonda lekkinud kogused.



Joonis 3. Naftatankerite keskmiste (7-700 t) ja suurte (>700 t) naftalekete arvukus aastakümnnendi kaupa aastast 1970 kuni 2016 (andmed: UNCTADstat).

Selgema pildi loomiseks loetlen alljärgnevalt peamised olukorrad, mil tankeritest naftat keskkonda lekib (ITOPF, 2016):

- kokkupõrge teise laevaga;
- karile sõitmine;
- kere purunemine;
- tulekahju/plahvatus.

Milliseid naftareostuse allikaid on veel peale naftatankerite õnnetuste? Naftapuurtornid on meres suurimad antropogeensed reostusallikad. Puurtornidel toimuvad õnnetused võivad olla põhjustatud nii mehhaanilise rikke kui ka inimhooletuse poolt. Asjakohaseks näiteks on 20. aprillil, 2010. a. toimunud *Deepwater Horizon*'i puurtorni plahvatus, mis põhjustas USA vetes suurima naftalekke. Mehhiko lahte paisati ligikaudu 780,000 m³ naftat. See õnnetus oli pretsedenditu oma ulatuses - reostus kattis 176,100 km² suuruse ala, mis mõjutas kogu Mehhiko lahe ning selle ranniku ökosüsteeme (National Research Council, 2013). Mehhiko lahte kogunenud reostuse eemaldamiseks kasutati mitmeid eksperimentaalseid meetodeid, millest ükski ei andnud soovitud tulemusi ning kaks aastat hiljem olid mitmed rannikud endiselt saastunud. Oluliseks asjaoluks oli suutmatus leket peatada. Uuring õnnetuse

põhjustesse avalikustas, et tegemist oli nii inimhooletuse kui ka mehhaanilise rikkega (National Research Council, 2013). Nimelt *blowout preventer*, mille ülesandeks oli peatada toornafta pääsemine keskkonda, plahvatas metaanilekke tõttu. Lahtist puurkaevu ei suudetud toruga uuesti ühendada, ning leke kestis 87 päeva. Samal põhjusel toimus plahvatus *Ixtoc I* puurtornis 1989. aastal, mille tõttu lekkis keskkonda 480,000 m³ naftat (WHOI, 2014). Vaatamata sellele, et analoogne sündmus oli varem aset leidnud, on üllatav, et DWH lekke peatamine oli niivõrd halvasti organiseeritud ja aeganõudev.

Kuigi koguse poolest satub kõige rohkem naftat keskkonda loodusliku imbumise kaudu, siis suured kogused, mis ootamatult lühikese aja jooksul keskkonda satuvad põhjustavad kõige suuremaid muutusi. Ka selle töö kirjutamise ajal, 6. jaanuaril, 2018, põrkasid Hiina lääneranniku lähedal kokku kaubalaev ja Iraani naftatanker *Sanchi*, mis transportis 136,000 m³ kergeid naftasaadusi. Plahvatus purustas tankeri kere, ning kondensaad hakkas levima üle 100 km² suuruse laiguna (Reuters, 2018). Erinevalt toornaftast on kergel kondensaadil toksilised mõjud, kuid keskkonnamõju hinnangut pole veel tehtud.

Naftareostuse õnnetuse järgselt hakkavad saadused koheselt lagunema ning selle füüsikalised ja keemilised omadused muutuvad ajapikku. Levimine, aurustumine, hajumine ja emulgeerumine on tähtsad protsessid naftareostuse varases staadiumis, kuid fotooksüdatsioon ja biolagunemine otsustavad pikemas perspektiivis ühendite saatuse. Nende protsesside kiirust mõjutavad ilmastikutingimused ja reoaine tihedus, lahustuvus ning viskoossus.

1.1.2 NAFTAREOSTUSE LEVIK JA MÕJU RANNIKULE

Aeglaste reageerimise tõttu võib avamerel toimunud laevaõnnetusest või puurtorni plahvatusel lekinud nafta levida rannikule. Õli levikukiirus ning sellest tulenev kahju elustikule sõltub nafta omadustest. Mida kergema õliga on tegemist, seda kiiremini see levib – näiteks autobensiin levib palju kiiremini kui toornafta *Deepwater Horizon*'ilt (National Research Council, 2003). Raskemad naftasaadused (nt kütteõli) on reeglipäraselt vähemtoksilised võrreldes kergemate saadustega. Viskoosete naftasaaduste puhul ei seisne ohtlikkus nende toksilisuses, vaid pigem lämmatavas mõjus rannikukooslustele. Seda sellega pärast, et raskemad õlid lahustuvad kehvemini ja nende biosaadavus organismidele on madalam (Guibert *et al.*, 2015). Seevastu kerge naftasaadus (nt bensiin) on kõrgema biosaadavuse tõttu elustikule toksilisem. Kergemad saadused aga hajuvad kiiremini läbi aurumise ning hajumise, mistõttu

võivad nad kokkuvõttes olla vähemkahjustavamad kui raskemad naftasaadused (ITOPF, 2014a).

Seda, kuidas reostus hakkab rannikule mõjuma sõltub rannikuala topograafiast ning selle keskkonna erinevatest abiootilistest teguritest, näiteks lainete energia. Kui tegemist on avatud rannikuga, kus on aastaringselt tugev lainetus, siis on reoained sellises keskkonnas vähepüsivad ning biolagunemine tõhus. Kujutage ette vertikaalset kaljuseina (tabel 1), millel on kõrge lainete aktiivsus - naftasaadused mõjutavad seda vähem, sest tagasiliikuvad lained hoiavad õlilaike rannikult eemale ning taastumine võib olla täielik juba mõne kuuga. Teisest küljest võivad naftasaadused mangroovidesse või soodesse sattudes olla kaitstud murenemist põhjustavate protsesside eest, ning seetõttu endeemset elustikku kahjustada mitmeid aastaid (Zhu *et al.*, 2001). Lisaks sellele sõltub reoaine pinnasesse imbumise sügavus ja kiirus rannikusubstraadi poorsusest. Jämedateralistes kivi- ja liivarandades tungivad naftaosakesed sügavamale ja jäävad sinna pikemaks (eriti kui on kaitse lainete eest), võrreldes peeneteralisemate savi- ja mullakallastega (Zhu *et al.*, 2001). Seega ranniku tundlikkust reostusele kujundavad looduslikud eemaldusprotsessid, bioloogiline produktiivsus ja tundlikkus ning õli eemaldamise kergus. Alljärgnevalt on toodud keskkonnatundlikkuse indeksid (KTI), mis iseloomustavad iga rannikutüübi tundlikkust naftareostusele (Hayes *et al.*, 1978):

Tabel 1. Rannikutüüpide tundlikkus naftareostusele, kus 1 – kõige vastupidavam ja 10 – kõige tundlikum (Zhu *et al.*, 2003)

Keskkonnatundlikkuse indeks (KTI)	Rannikutüüp
1	Avatud kivrannikud
	Muulid ja kaid
2	Murrutuslavad
3	Peeneteralised liivarannikud
4	Jämedateralised liivarannikud
5	Liiva ja kruusa segu
6	Kruusarannad
7	Katteta madalikud
8	Varjatud kivrannikud
9	Varjatud madalikud
10	Soolasood ja mangroovid

Skaalal kõige kõrgemal asuvad varjatud rannikud ja mangroovid, kuna sealne elustik on reostusele tundlik ja ala on raskesti ligipääsetav koristusmeeskondadele. Kruusarannikud on tundlikkuse skaalal randade seas kõige kõrgemal kohal, kuna substraadi poorsus ja läbilaskvus võimaldab reostusel sügavale liikuda. Sügaval pinnases, kus on kaitse füüsiliste mõjude eest on murenemise protsessid pea täielikult seiskunud ja saadused võivad jääda aastateks püsima (National Research Council, 2003).

Sõltuvalt sellest, mis õliga on tegemist, võivad naftasaadused rannikule jõuda kahel erineval kujul - õhukeste kihtide või paksude laikudena. Nagu eelnevalt mainitud, siis lisaks füüsilise seisu mõjutamisele on see ka oluline elustikule, sest kergetel saadustel, mis levivad õhukeste laikudena, on kõrgem akuutne toksilisus ja raskemad saadused lämmatavad elustikku (National Research Council, 2003) Paljud rannikud on tuntud sellepoolest, et sinna koguneb hoovuste tõttu prahti ja kinnistumata vetikaid. Samamoodi levivad sinna õnnetuste korral naftalaigud. Reostus katab enamasti ranniku ebaühtlaselt isegi suhteliselt heterogeense ranniku puhul, mis tähendab, et suur osa saaduseid on kontsentreeritud väiksesse alasse (IPIECA-IOGP, 2016).

Naftasaaduste käitumine ja saatus on arktilises keskkonnas drastiliselt mõjutatud jää ning madalate temperatuuride poolt. Isegi jää vanus ja tüüp mõjutab reostuse levikut – näiteks ühe aasta vanune jää koosneb mikrokanalitest, mis võimaldavad naftasaadustel pinnale tõusta. Võrreldes soojema kliimaga on Arktikas aurumiskiirus aeglasem nii madala temperatuuri kui ka suurenenud adsorptsiooni tõttu, mis suurendavad naftasaaduste püsivust keskkonnas (National Research Council, 2003). Saaduste kleepumine jää külge takistab teiste murenemisprotsesside toimumist - näiteks jää küljes olev nafta ei levi õhukese kihina ega moodusta emulsioone. Baffini saare naftareostuse projekt (*BIOS Project*) Arktikas demonstreeris, et karedasse substraati tungides võivad tekkida püsivad pinnaalused õlikihid kuid kuna ka kergete naftasaaduste viskoossus on külmas kliimas suhteliselt kõrge siis tungimine peeneteralisse rannikusubstraati toimub väikeses ulatuses (IPIECA-IOGP, 2016).

Erinevad füüsikalised-keemilised protsessid lagundavad naftasaadusi, mis viib reostuse akuutse toksilisuse vähenemiseni. Alles jääb tõrva-taoline jääk, mis sisaldab suurtes kogustes aeglaselt biolagunevat kõrgmolekulaarseid süsivesinikke. Toksilisuse vähenedes hakkab üha rohkem loomastikku ja taimestikku taas koloniseerima saastatud ala, mis aitab kaasa lagundamisele. Naftareostuse ökoloogilisi mõjusid kirjeldan ma järgnevas peatükis.

1.1.3 REOSTUSE ÖKOLOOGILINE MÕJU

RANNIKUTAIMED JA SELGROOTUD

Rannikuäärsed organismid kogeavad mitmeid erinevaid looduslike stressoreid. Pidevalt tuleb taluda lainete peksmist, sette liikumist, loodete mõju, muutusi temperatuuris, soolsuses ning toidu- ja hapnikukogustes. Paljudel taimedel on looduslikud mehhanismid, mis kaitsevad neid muuhulgas ka naftareostuse eest – näiteks enamusel merevetikatel on paks limakiht, mis tõrjub naftasaadusi (IPIECA-IOGP, 2014).

Nagu ka nafta leviku ja keskkonnapüsivuse modelleerimisel on oluline teada, mis tüüpi naftasaadusega on tegemist, et hinnata võimalikku kahju ranniku floorale. Toornafta jt rasked naftasaadused katavad lehti ning pärsivad taimede transpiratsiooni. Viskoossed naftasaadused võivad ka veetaimede varsi murda ning lehti ja juuri lämmatada, nagu täheldati *Deepwater Horizon*'i õnnetuse puhul, millest lekkinud nafta kattis 1700 km pikkuse lõigu märgalast (National Research Council, 2013). Kuna märgalade ja mangroovide taimed kasutavad õhujuuri hapniku saamiseks, on need alad eriti tundlikud naftareostusele. Kergemate naftasaaduste mõjud taimedele on üldjoontes samad ja toksiline toime esineb juhul, kui naftasaadused tungivad sügavale pinnasesse, kus toimub pikaajaline kokkupuude juurtega (National Research Council, 2003)

Naftareostuse jõudmine rannikule põhjustab suuri muutusi nii loodetevööndi kui ka pritsmete vööndi elustikus. Sarnaselt rannikutüüpidele on ka teatud loomad, näiteks koorikloomad ja kirpvähilised, kes on tundlikumad naftareostusele ja kelle kooslused võivad pöördumatult kahjustada saada. Rannikuäärsed on tavaliselt koduks paljudele uruloomadele, nagu hulkharjasussid (*Polychaeta*). Uuringud reostuse mõjudesse on näidanud, et enim reostunud aladel elavatel uruloomadel on kasv aeglustunud (Beyer *et al.*, 2016). Koorikloomade puhul täheldati reostuse akuutset toksilisust, ehk ägedat mürgitust (IPIECA-IOGP, 2016). See tähendab seda, et lühiajaline kokkupuude reoainega lõppes kas tõsise kahju või surmaga (Hellat *et al.*, 2012). Loodetevööndi piirkondi hõivavaid kirpvähilisi reostuse järgselt uurides leiti, et terved kolooniad kadusid peaaegu täielikult kui nad puutusid kokku suurte lahustunud süsivesinike kogustega (IPIECA-IOGP, 2016).

Deepwater Horizon'i õnnetuse tagajärjel arvati, et filtreerijad nagu, tõruvähid (*Balanus* sp.), karbid (*Geukensia demissa*) ja austrid (*Grassotrea virginica*) akumuleerivad toitumise tõttu

oma kudesse reoaineid (Beyer *et al.*, 2016). Huvitaval kombel leiti, et kuigi nad ei olnud võimelised süsivesinike kiiresti metaboliseerima, siis nende lagundamine kestis mitmeid kuid (IPIECA-IOGP, 2016). Seetõttu kasutataksegi karpe reostuse ja tervendamise näitajatena. Kuigi nad on võimelised süsivesinike lagundama, siis esinevad subletaalsed mõjud – vähenenud kasv ja sigimisvõimekus ning muud koedefektid. Sarnaseid tulemusi leiti ka sessiilsete selgrootute kohta, nagu käsnad ja korallid, kes on substraadile kinnitunud ning ei ole võimelised ka parima tahtmise juures reostunud rannikult lahkuma. Etnoyer *et al.* (2015) tuvastasid korallidel erodeerunud polüüpe, pleekimist, ülekasvu ning katkiseid harusid *Deepwater Horizon*’i järgses uuringus.

KALAD JA MUUD SELGROOGSED

Rannikud on selgroogsetele olulisteks sigimis-, pesitsus- ja toitumispaikadeks. Lõhe, forell ning teised migreeruvad kalad võivad reostusega kokku puutuda saastunud loodetevööndile sattudes. Mitmed reostusjärgsed uuringud on tuvastanud toksilisi mõjusid rannikualadel kudevatele populatsioonidele, eriti kalade embrüotele. Noorkalad on süsivesinikele eriti tundlikud, samas aga kalade sigimisstrateegia võimaldab populatsioonil ellu jääda ka paljude noorte isendite hukkumise puhul. See tähendab seda, et vaid väike osa noori peab ellu jääma, et populatsioon oleks jätkusuutlik (IPIECA-IOGP, 2016). Laborikatsetes, kus uuriti naftareostuse mõju Vaikse ookeani heeringamarjale, tekkisid maimudel morfoloogilised deformatsioonid ja geneetilised vead, mis põhjustasid isendi ebanormaalselt väikest kasvu või surma. Paljudel juhtudel arenesid kalad, kellel puudus ujumisvõime (Carls *et al.*, 1998). Lisaks sellele kahanes keskmise haudumise aeg reostuse kontsentratsiooni kasvuga. Polütsükliliste aromaatsete süsivesinike kokkupuutel tekkinud füüsilisi defekte on tuvastatud mitmeid - kahanenud aju, kitsenenud selg- ja kõhuuimed, lülisamba kõverdumine, lõualuu puudumine, veresoonte tursumine, kahanenud võrkkesta pigmenteerumine jne. (Carls *et al.*, 1998). Kõikide defektide esinemine kasvas koos süsivesinike kontsentratsioonidega.

Embrüote kokkupuude PAH’idega väljendub erinevalt, kuid pikaajaline toime krooniliselt mõjutatud populatsioonidele on veel teadmata. Mitmed laborikatsed on näidanud, et naftasaaduse kontsentratsioonid vähendavad populatsiooni suurust. Gorbuuša (*Oncorhynchus gorbuscha*) embrüote kokkupuutel madalate PAH kontsentratsioonidega vähendas populatsiooni ellujäämisvõimalust sigimisvõimelisteks isenditeks 50%-ni (Heintz, 2007). Sellest tuleneb, et rängalt reostunud populatsioonid võivad üsna väheste põlvkondade jooksul hukkuda. Kui 100% populatsioonist puutus kokku reostusega toimus 80% langus populatsiooni

produktiivsuses ja tõenäosus järgmise 35 aasta jooksul välja surra oli 11% (Heintz, 2007). Isenditel, kes koheselt ei hukku ilmnevad mitmed subletaalsed tunnused, mis koostoimel keskkonnatingimustega võivad viivad surmani.

Kõigile on tuttavad pildid naftakatastroofide järgselt naftaga määrdunud merelindudest, kuid kuidas nafta lindudele mõjub? Rannikualadel on suur tähtsus lindude jaoks toitumis- ja pesitsuspaikadena, mistõttu on merelinnud eriti ohustatud kui nende elupaik või saak saastub. Akuutsetele efektidele (nt kõrge suremus) lisaks võivad madalad süsivesinike kogused mõjutada sigimisvõimekust ja ellujäämist (National Research Council, 2003). Naftaga määrdunud merelindude sulgede vettpidavad omadused on rikunud ning vesi pääseb nahani, mistõttu peab lind kulutama lisaenergiat kehasoojuse hoidmiseks. Nokaga naftat eemaldades võib see seedetrakti sattuda, põhjustades kahju siseorganitele (Eesti Loodus, 2008). Lindudel võib kujuneda aneemia, ehk kehvveresus, mistõttu lind ei suuda sukelduda ega toitu hankida (Merivee ja Kaldma, 2008). Mõju lindudele võib olla ka kaudne - õlireostus võib häirida toiduahelaid ning vähendada rändlindude toiduvarusid. Intensiivsed reostuse likvideerimise meetodid võivad veel enam häirida lindude elupaiku ja toitumisalasid, muutes toidu otsimise raskemaks ning ebaefektiivsemaks (IPIECA-IOGP, 2016).

1.1.4 RANNIKULE JÕUDNUD NAFTAREOSTUSE LIKVIDEERIMISE MEETODID

Eelnevas peatükis kirjeldasin erinevaid füüsikalisi ja keemilisi protsesse, mis nii merel kui ka rannikul kompleksseid orgaanilisi molekule lihtsateks ühenditeks lagundavad. Juhul kui õnnetusele reageeritakse aeglaselt liigub reostus rannikule, kus selle mõju loodusele on palju kahjulikum. Selleks, et reostus võimalikult kiiresti likvideerida nii, et tundlikku elustikku võimalikult vähe kahjustada tuleb kombineerida erinevaid keemilisi, füüsikalisi kui ka bioloogilisi meetodeid.

FÜÜSIKALISED MEETODID NAFTAREOSTUSE EEMALDAMISEKS

Naftareostuse likvideerimise kiirendamiseks on õnnetuse toimumise hetkel kasulik teada, milline on reostuse võimalik liikumine meres. Kõrgematel laiuskraadidel, eriti arktilises kliimas, tuleb arvestada sellega, et naftalaikude levikut mõjutavad jää dünaamilised omadused, nagu triivikiirus, mõrade hulk ja jääkihi paksus (Olason *et al.*, 2016). Kasutades teadmisi ookeanihoovustest, tuultest ja lainetest on võimalik luua mudeleid, mis ennustavad reostuse liikumissuunda. See omakorda võimaldab poomide abil reostust suunata eemale tundlikust

rannikuelustikust ning õlilaikude ümber piiramist kogumise eesmärkidel (IPIECA-IOGP, 2016).

Rannikule jõudnud naftareostuse likvideerimise esimeses faasis on oluline, et ei toimuks reostuse edasist levikut. Kogumine saab toimuda nii käsitsi kui ka mehaaniliselt. Käsitsi eemaldades kasutatakse erinevaid käsitööriistu (nt rehad, harjad ja labidad), et koguda reostus rannikul olevatesse konteineritesse, kus toimub edasine transport ja töötlemine. See meetod on sobilik siis, kui eemaldada tuleb kergemaid õlisid väikestes kogustes ja masinaid pole vaja. Eeliseks on odav hind ja suure rahvamassiga kaasnev meediakajastus, kuid rahvahulga liikumisi tuleb hoolikalt koordineerida, et sammudes ei tekitataks elustikule lisakahju (nt vetikad ja lindude pesitsusalad) (NOAA, 1994).

Raskema reostuse korral kasutatakse pehmepinnalistel rannaaladel ekskavaatoreid ja kaevatakse veepiirile kraave, kuhu õli koguneb. Naftaga täitunud kraavid pumbatakse mõõna ajal tühjaks, muidu võib reostus seguneda substraadiga ja eemaldamine muutub keerulisemaks. Alternatiivina saab masinaid kasutada selleks, et kopaga otse merepinnalt või substraadilt ujuvat õli eemaldada. Raskete masinate kasutamise juures tuleb jälgida, et reostunud pinnasel sõites või liiga sügavale kaevates ei surutaks õli sügavamale pinnasesse (ITOPF, 2014b).



Joonis 4. Raskete masinate kasutamine võib õli sügavamale pinnasesse suruda, muutes eemaldamise raskemaks (ITOPF, 2014b).

Naftasaaduste madalat tihedust ära kasutades on kõige kasulikum eemaldada reostus vaakumpumpade ja -veokitega (Ghannam *et al.*, 2002). Vaakumpumpadega saab eemaldada

õlilaike pea kõikidelt rannikutüüpidelt, ning tavaliselt kasutatakse neid samaaegselt survepesuritega, mis vabastavad reostuse substraadilt. Kui ala on ligipääsetav saab suurtes kogustes naftareostust likvideerida veokitega, kuid sealjuures peab olema hoolikas, et ei eemaldataks väiksemaid loomi ja taimi (National Research Council, 2013). Selle meetodi efektiivsus sõltub õlitüübist ja –kogusest ning kasutatava pumba tehnilistest omadustest (NOAA, 1994). Pumpade efektiivsust saab suurendada siis, kui koos pumpadega kasutada poome või kaapasid, mis nafta väiksele alale kontsentreerivad.

Füüsilistest meetoditest kasutatakse pea alati ka kuuma vee kõrgsurvepesuritega reostuse eemaldamist. See on eriti efektiivne kivirannikutel, kus reostuse eemaldamine on tavapäraselt raskendatud. Ehkki tegemist on tõhusa meetodiga, kaasneb oht, et hooletul kasutamisel kahjustatakse või tapetakse rannikuelustikku. Niimoodi juhtus 1989. a. *Exxon Valdez* õnnetuse puhul, kus agressiivsete puhastusmeetodite tagajärjel suri suur hulk taimi ja loomi (NOAA, 2018). Kõrgsurvepesurite kasutamine võib reostunud pinnalt ajada nafta saastumata pinnasele või veel sügavamale substraati, seega tuleb seda meetodit kasutada väga teadlikult, võttes arvesse reostuse ulatust ja rannikutüüpi (National Research Council, 2013).

Lisaks sellele saab poorsesse substraati lõksu jäänud reostuse välja ujutada, pumbates suurtes kogustes vett pinnasesse madalal rõhul. Selleks protsessiks kasutatakse tihti merevett. Kui õli suunatakse merre, siis paigaldatakse sinna eelnevalt poomid, mis välja ujutatud õli kokku koguvad. Teadlikult kasutades põhjustab reostuse välja ujutamine rannikuelustikule minimaalset füüsilist kahju, seega tegemist on soovitud meetodiga, et ligipääsematust keskkonnast naftat eemaldada (NOAA, 1994).

Passiivsete meetodite kasutamine hõlmab õli kogumist loodetevööndisse paigutatud oleofiilsete absorbentidega. Imenduv materjal pannakse reostunud substraadile (pinnas või vesi), kus see hakkab lainete mõjul liikuvat õli endasse imama. Materjali statsionaarsuse tõttu kogub see ainult reostust, mis lainete või loodete mõjul koos veega liigub. Imendumise efektiivsus sõltub sorbendi mahutavusest, õli liikuvusest ja lagundamisprotsesside kiirusest (NOAA, 1994). Sorbente kasutatakse piiratud ligipääsuga rannikutel reostuse teises faasis, kui suurem osa õlist on eemaldatud. Kui sorbendi maht on täis, eemaldatakse see keskkonnast koos kogutud õliga. Passiivse loomu tõttu on tegemist küll aeglase, kuid odava ja bioloogiliselt mittekahjuliku variandiga (Bayat *et al.*, 2005).

KEEMILISED MEETODID NAFTAREOSTUSE EEMALDAMISEKS

Rannikule jõudnud naftareostuse likvideerimiseks mõeldud keemilisi aineid saab liigitada kolme kategooriasse (EPA, 1993):

1. Mitte-pindaktiivsed lahustid;
2. Keemilised dispergandid;
3. Pindaktiivsed ained, mis on spetsiifiliselt mõeldud substraati kinnitunud õli vabastamiseks.

Mitte-pindaktiivsed lahustid ja pindaktiivsed ained (1. ja 3. kategooria ained, vastavalt) vabastavad reostuse substraadilt, põhjustades naftatilkade koondumist laikudeks, mida saab kergesti eemaldada. Keemilised dispergandid (2. kategooria) just kergendavad õli hajumist vette (National Research Council, 2013). Selliste ainete kasutamine on sobilik madalapoorseusega pinnastes ja avamerel, kus hajumine toimub kiiresti ning reostuse kontsentratsioon jääb madalaks. Seega sõltub keemilise aine valik suuresti reostunud keskkonna tingimustest.

Keemilised dispergandid on segud pindaktiivsetest ainetest ja lahustitest, mida pihustatakse reostusele, et vähendada molekulide vahelisi sidemeid (National Research Council, 2013). Lahustid on selleks, et võimaldada ainete lahustumist, pinnasesse tungimist ja segunemist substraadis olevate õlitilkadega. Pindaktiivsed ained vähendavad pindpinevust, soodustades õli hajutamist veesambasse, kus toimub naftatilkade segunemine veeliikumisega (EPA 1993). Avamerel rakendades võivad dispergandid olla väga efektiivsed reostuse lagundamisel enne rannikule jõudmist. Lainete koosmõjul lagunevad naftalaigud väiksemateks tilkadeks, mis neutraalse ujuvuse tõttu hajuvad veekihtidesse ja reostuse kontsentratsioon langeb alla toksilise piiri (National Research Council, 2013). Lisaks kontsentratsiooni vähendamisele kasvab tilkade moodustumisel naftasaaduste eripind, ehk siis on rohkem pinda, kuhu mikroorganismid saavad kinnituda ja teostada biolagundamist (eeldusel, et kontsentratsioonid pole toksilised) (Venosa ja Zhu, 2003).

Ainult füüsikaliste meetodite kasutamisel on mitmeid puudusi, nagu ajaline ja rahaline kulu ning negatiivne mõju keskkonnale. Kemikaalide kasutamine võimaldab reostuse kiire eemaldamise tundliku floora ja faunaga rannikutelt, kus õlide hilisem pinnaletõusmine võib ümbritsevat keskkonda rohkem kahjustada. Arvestada tuleb ka siin teatud piirangutega - endeemsel elustikul võib tekkida toksiline reaktsioon puhastusvahenditele, ning õli mobiliseerimise tagajärjel võib see hoopis sügavamale pinnasesse liikuda. Juhul kui toksiliste

mõjude ning reostuse edasine levik on vähetõenäoline, tuleks kemikaalide kasutamist reostuse eemaldamiseks kaaluda.

1.2 NAFTASAADUSTE BIOLAGUNEMINE RANNAS

Naftasaaduste biolagunemine põhineb kindlat tüüpi mikroorganismidel (ing k *hydrocarbonoclastic bacteria*), kellel on nafta süsivesinike oksüdeerimise võime. Teatakse üle 200 erineva bakteri, pärmi ja seene liigi, kes suudavad süsivesinikke lagundada (Zhu *et al.*, 2001). Neist kõige laiemalt levinumad on välja toodud tabelis 2. Arktilises kliimas lagundavad süsivesinike peamisteks süsivesinike laia temperatuuritaluvusega bakterid. Mageveekogudes mängivad selles protsessis olulist rolli lisaks pärmid ja ka seened (Zhu *et al.*, 2001; Cooney, 1984).

Tabel 2. Tuntuimad süsivesinikke lagundavad bakterid, pärmid ja seened (Zhu *et al.*, 2001; Atlas, 1981).

Bakterid	Pärmid ja seened
<i>Achromobacter</i>	Aspergillus
Acinetobacter	Candida
Alcaligenes	Cladosporium
Ahrobacter	Penicillium
Brevibacterium	Rhodotorula
Cornybacterium	Sporabolomyces
Flavobacterium	Trichoderma
Nocardia	
Pseudomonas	
Vibrio	

Kuigi tegemist on kõikjal leiduvate mikroorganismidega, siis nende arvukus sõltub suuresti keskkonna puhtusest. Rikkumata ökosüsteemides võivad ülalmainitud mikroorganismid moodustada vaid 0.1% mikroobikooslusest, kuid naftareostusega rannikul võib nende osakaal ulatuda 100%-ni (Zhu *et al.*, 2001; Atlas, 1981). Siinkohal tuleb mainida, et ühegi bakteri, pärmi või seene metaboolne võimekus pole nii suur, et ta suudaks lagundada kõiki toornaftas leiduvaid ühendeid. On vaid loomulik, et nii kompleksse ühendi lagundamiseks on arenenud samaväärse keerukusega bakterite kooslused. Veel enam, need kooslused muutuvad, mida rohkem toornafta ühendit edasi lagundatakse - kui ühe mikroobipopulatsiooni jaoks sobilik substraat tarbitakse ära ja nende arvukus langeb, tulevad asemele teised, kes on võimelised allesjäänud ühendeid metaboliseerima (Hazen *et al.*, 2016).

Naftasaaduste biolagundamist ja keskkonna mikroorganismide kooslust mõjutavad mitmed keskkonnategurid, millest olulisim on nafta kontsentratsioon (Abed *et al.*, 2014). Märgalade mikroobikoosluse mitmekesisus oli märgatavalt madalam kõrge nafta kontsentratsiooniga mattides. Kuigi naftasaaduste küllus soodustab süsivesinike lagundajate kasvu, siis toksilised ühendid piiravad teiste organismide levikut (Abed *et al.*, 2014). Esialgsed füüsikalised lagundamisprotsessid, nagu fotooksüdatsioon, pigem soodustavad kõikide mikroorganismide tegevust, kuna nende käigus eemaldatakse toksilisi lenduvaid ühendeid ning tekitatakse paremini lahustuvaid ühendeid, mida lagundatakse edasi (Zhu *et al.*, 2001). Temperatuuril on ka oluline roll, mõjutades nii õli omadusi (nt viskoossus ja lenduvus) ja ka mikroorganismide aktiivsust, mis kahaneb temperatuuri langemisega, vähendades biolagundamise kiirust. Merekeskkonnas toimuva biolagunemise optimaalne temperatuur on vahemikus 10...20°C, kuid biolagundamist on täheldatud ka vahemikus 0...2°C (Zhu *et al.*, 2001). Muutused pH's mõjutavad mikroobikooslusi otseselt, sest äärmuslikud pH väärtused pärsivad mikroobide lagundamisvõimet ja kaudselt, muutes ühendite lahustuvust (Radwan 2008).

Paksud, tihked õlilaigud piiravad gaasivahetust vesi-õhk keskkonna vahel ning seetõttu võib vähenenud hapniku ja valguse kogus muuta mikroorganismide kooslusi (Abed *et al.*, 2014). Avamerel hapnik ei limiteeri biolagunemise kiirust, kuid märgaladel, rannikualadel ja setetes piirab pigem hapnik kui toitained (Nõlvak, 2012). Bakterid on võimelised mitmeid süsivesinike lagundama nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes. Esialgne lagundamine toimub oksüdatiivse protsessina ensüümide nagu oksügenaaside ja peroksüdaaside vahendusel (Carter *et al.*, 2016). Aeroobne lagundamine toimub peamiselt veekogude ülemistes kihtides, kus hapnik ei ole piiravaks teguriks, ning anaeroobne lagundamine anoksilites setetes. Süsivesinike lagundamine saab toimuda hapniku puudumisel kui esinevad teised elektronide aktseptorid nagu Fe^{3+} , SO_4^{2-} ja NO_3^- , kuid see on kordades aeglasem kui kasutades hapniku elektroni aktseptorina (Carter *et al.*, 2016).

Biolagundamist on põhjalikult uuritud alkaanide puhul, mis moodustavad suure osa toornaftas leiduvatest ühenditest ning mida toodavad mitmed taimed, vetikad ja mikroorganismid (Beilen ja Funhoff, 2006). Tegemist on suhteliselt inertsete redutseeritud molekulidega, mis lahustuvad vees kehvasti ja mille kasutamiseks on vaja kõrget aktivatsioonienergiat (Yang *et al.*, 2009). Vaatamata nendele takistustele on paljud mikroorganismid võimelised neid ühendeid kasutama süsiniku ja energia allikana. Teatakse mitmeid ensüüme, mis katalüüsivad alkaanide aeroobset aktiveerimist, kuid naftat lagundavate bakterite seas on enim levinud AlkB-tüüpi alkaani

hüdrosülaasid (Guibert *et al.*, 2015). Alk süsteeme on seostatud alifaatsete süsivesinike biolagundamisega ja seetõttu on neid põhjalikult uuritud. Krooniliselt saastatud subantarktilise regiooni rannikualade setetes on kõige levinumad alkaanide lagundajad *Bacteroidetes* ja *Proteobacteria* hõimkonna, peamiselt *Flavobacteria* ja *Delta* klasside, esindajad, vastavalt. Metagenoomseid meetodeid ja 16S rRNA geenide järjestamist kasutades tuvastati bakterid, kes elavad kõrgete süsivesinike kontsentratsioonidega aladel ja kellel esineb märkimisväärne võime alkaane lagundada Alk süsteemidega (Guibert *et al.*, 2015).

Suurte õnnetuste, nagu *Deepwater Horizon*, tagajärjel, kus keskkonda sisenev süsivesinike kogus suureneb drastiliselt lühikese perioodi jooksul, toimuvad suured muutused mikroobide populatsioonides ja nende funktsioonides (nt süsivesinike lagundamise ja lämmastikuringe radades) (Guibert *et al.*, 2015). Kroonilise saaste puhul ei ole muutused nii ilmselged. Arktistes setetes leiti saastatud aladel suurem ensüümi AlkB geeni mitmekesisus võrreldes puhaste piirkondadega. Seega AlkB kontsentratsioone tuvastades on suudetud põhjalikult mõista saastunud arktiliste alade mikroobide fülogeneetilist ja funktsionaalset mitmekesisust (Guibert *et al.*, 2015).

Biolagundamise puuduseks on see, et selle efektiivsus sõltub suuresti reostunud keskkonnast, seega iga naftalekke puhul tuleb meetodit kohandada vastavalt selle keskkonna eripäradele (Hazen *et al.*, 2015). Tegemist on suhteliselt aeglase protsessiga ning laborikatsete kontrollitud keskkonnas saadud edukaid tulemusi ei saa alati looduses jäljendada. Sellegipoolest on tegemist odava, keskkonnasõbraliku ja vähest hooldust nõudva meetodiga, mida tihti peale eelistatakse keemilistele ja füüsikalistele meetoditele (Nõlvak, 2012). Biolagundamist on hea kasutada lisaks füüsikalistele ja keemilistele meetoditele, kui need pole soovitud tulemust saavutanud.

SEIRATAV LOODUSLIK TERVENEMINE

Osadel juhtudel on kõige parem biolagunemise protsessi aktiivselt mitte mõjutada. See tuleb kõne alla eelkõige tundlikel rannikutel, kus igasugunegi sekkumine põhjustab rohkem kahju. Võib ka juhtuda, et reostuse lagundamisele ei olegi võimalik kaasa aidata, kuna reostatud alale pole võimalik ligi pääseda kauguse (nt. osad arktilised piirkonnad) või ebapiisavate ressursside tõttu. Sellistel puhkudel on looduslik tervenemine ainukene variant (National Research Council, 2013). Seda määratletakse kui protsessi, mille puhul reoaine toksilisus, hulk ning liikuvus keskkonnas vähenevad inimese sekkumiseta (Nõlvak jt, 2007). Reoaine füüsikalis-

keemiline transformeerumine toimub läbi hulga erinevate looduslike protsesside – lahustumine, settimine, adsorptsioon, *et al.* (vt. joonis 2) – millest oli lähemalt juttu peatükis 1.1. Peale meetodi keskkonnasõbralikkuse on looduslik tervenemine sobilik ka paindlikkuse ja odavuse tõttu.

Seiramise keerulisus sõltub analüüsitavast keskkonnast - tavaliselt viiakse pinnase-, vee- või gaasiproov laborisse. Keemiliste meetoditega hindamine võib osutuda keeruliseks pinnase heterogeensuse ning reoainetele mõjuvate protsesside (nt lendumine) tõttu (Kriipsalu jt, 2016). Lisaks laboriuuringutest saadud tulemustele tuleb arvestada katsekohaga seonduvaid näitajaid, nagu keskkonna pH, geokeemilised ja hüdrogeoloogilised omadused. Need on olulised, kuna väikesed muutused füüsikalistes ja keemilistes tingimustes võivad põhjustada suuri muutusi mikroobikoosluse koosseisus ja aktiivsuses. Keemiliste meetodite täienduseks kasutatakse ka bakterite kultiveerimisel põhinevaid mikrobioloogilisi meetodeid (nt arvukuse loendamine söötmetassidel) (Nõlvak, 2012).

Keerulisemate meetodite hulka kuuluvad mikrokosmiuuringud, mille puhul vee- või pinnaseproove hoitakse pikka aega laboris keskkonna algtingimustele võimalikult sarnastes oludes. Taoliste uuringute puhul jälgitakse toimuvaid protsesse ning reoainesisalduse vähenemist (Kriipsalu jt, 2016). Siiski, et kuni vaid 5% bakteriliikidest on laboritingimustes kultiveeritavad on hakatud eelistama molekulaarseid meetodeid, mis võimaldavad kiiresti saada teavet kogu bakterikoosluse kohta. Kasutades markergeenidel põhinevaid kultiveerimisest sõltumatuid meetodeid – nt polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) ja kvantitatiivne PCR (qPCR) – saab siduda biolagunemisprotsesse spetsiifiliste geenidega, seirata mikroobiokoosluste käitumist looduslikul tervenemisel ning määrata keskkonnale oluliste organismide arvukust (Kriipsalu jt, 2016).

Kõige täpsema hinnangu saamiseks tuleks keemilisi ja molekulaarseid meetodeid koos mikrokosmiuuringutega kasutada. Edukat tervenemist tõendavad muuhulgas saasteaine massi või kontsentratsiooni vähenemine ning laboriuuringute tulemused, mis tõestavad reostuspaigast saadud mikroorganismide suutlikkust saasteaineid lagundada (Nõlvak jt, 2007).

BIOSTIMULATSIOON

Naftareostuse tagajärjel merekeskkonda sisenenud süsiniku kogus stimuleerib mikroobide kasvu, ning piiravaks muutuvad hapniku, lämmastiku ja fosfori kontsentratsioonid. Teoorias

kulub 1 g süsivesinike rakuaineteks konverteerimiseks 150 mg lämmastikku ja 30 mg fosforit (Rosenberg ja Ron, 1996). Looduslikule tervendamisele saab ilma intensiivsete meetoditeta kaasa aidata biostimulatsiooni teel, mille puhul pinnase õhustamise ja pinnasesse toitesoolade lisamisega luuakse mikroorganismidele soodsam kasvukeskkond (Nõlvak jt, 2007).

Biostimulatsiooni üks peamisi eeliseid on, et protsess toimub selle keskkonnaga kohastunud mikroorganismidega ja lisatakse vaid toitaineid. Toitainete optimaalne tüüp ja kogus sõltub nafta omadustest ja keskkonnatingimustest - näiteks kehva puhvriga merevees võib ammoniaagi metaboliseerimisega kaasnev pH tõus inhibeerida süsivesinike lagundamist ja kasulikum on kasutada nitraati (Wenner *et al.*, 1994). Nitraati kasutades soodustatakse ka orgaaniliste ühendite anaeroobset lagundamist (Kriipsalu jt, 2016). Bakterite aktiivsuse tõstmine nõuab, et toitainete kogus oleks piisav, kuid seda on keeruline kontrollida pidevalt muutuv keskkonnas. Pealegi tuleb arvestada ka lisandite ökotoksikoloogiaga ning vältida toitainete liigset kasutamist.

Mikroorganismide kohastumuse, vastupidavuse ja aktiivsuse tagamiseks saab mineraalväetiste asemel kasutada ka surnud taimset biomassi (ing. k. *necrophytoremediation*). Taimejäägid, näiteks hein ja kõrred, mida toodetakse aastas umbes 2900 miljonit tonni, on ühed odavaimad põllumajanduse jäägid ja neid on edukalt kasutatud nafta süsivesinike lagundamise kiirendamiseks (Koshlaf *et al.* 2016).

BIOAUGMENTATSIOON

Alternatiiv või täiendav meetod biostimulatsioonile on bioaugmentatsioon, kus keskkonda inokuleeritakse süsivesinike lagundavaid mikroorganisme. Seda meetodit rakendatakse siis, kui endeemsete mikroorganismide populatsioonid pole võimelised kõiki reoaineid lagundama kataboolsete geenide (näiteks eelnevalt mainitud *alkB* alkaani hüdroksülaasi geen) puudumise tõttu (Koshlaf *et al.*, 2016). Teiseks võimaluseks on endeemsete liikide isendite lisamine põhjusel, et olemasolevate organismide arvukus on liiga madal või reostuse üleküllus on põhjustanud stressiseisundi ning viinud metaboolse aktiivsuse languseni. Uute organismide lisamine vähendab puhveraega, mis kulub enne kui hakatakse reoaineid lagundama. Bioaugmentatsiooni edukas rakendamine eeldab, et inokuleeritud mikroorganismide tüved oleks hästi kohanenud reostatud keskkonnaga ja suudaks seal aktiivselt tegutseda. Enne inokuleerimist tuleb arvestada endeemsete lagundajate, kiskjate ja teiste keskkonnaparameetritega (Zhu *et al.*, 2001).

Praktikas on saadud väga varieeruvaid tulemusi. Lebkowska *et al.* (2011) suutsid *Pseudomonas putida* ja *Pseudomonas mendocina* tüvesid lisades 25 päevaga pinnase diislikontsentratsiooni vähendada 81.98% võrra. Positiivseid tulemusi saadi ka lennukikütuse biolagunemise augmenteerimisel. Kuna ükski mikroobiliik ei suuda lagundada üle kahe toornaftas leiduva ühendiklassi, tuleb reostuse efektiivseks eemaldamiseks inokuleerida mitmeid liike (Wu *et al.*, 2016). Teisest küljest on mitmed uuringud näidanud, et eksogeensete mikroobide lisamine ei kiirenda süsivesinike lagundamist võrreldes loodusliku tervenemisega (Sheppard *et al.*, 2011).

Nii biostiumlatsioon kui ka bioaugmentatsioon on rannikutel kiirendanud süsivesinike biolagundamist, kuid hiljutised katsed on näidanud, et kõige tõhusamaid on kahe meetodi kombineerimine (Taccari *et al.*, 2011).

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 KATSE KIRJELDUS

Kütusega saastunud materjalist DNA eraldamiseks kõige sobilikuma meetodi väljaselgitamiseks võrreldi mulla-spetsiifilise (PowerSoil DNA Isolation Kit, Qiagen, Saksamaa) ja biokile-spetsiifilise (Dneasy PowerBiofilm Kit, Qiagen) DNA eralduskomplektiga DNA eraldamise saagist ning eraldatud DNA põhjal bakteriaalse 16S rRNA geeni arvukust ja amplifikatsiooni efektiivsust. Nende parameetrite hindamiseks korraldati laboris katse, milles kasutati aiamaalt pärit mineraalmulda (tolmjas saviliiv), millele lisati kolmes erinevas kontsentratsioonis (Tabel 3) laevakütust IFO 180 (LANKA IOC PLC). Mulla homogeniseerimiseks sõeluti niiske muld (sõela silma \varnothing 2 mm) ning seejärel kuivatati toatemperatuuril ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) 4 päeva jooksul, et saada õhkkuiv muld. Kindla kontsentratsiooni saavutamiseks mullas viidi esmalt väike kogus õli 5 ml tuubi ning seejärel lisati vajalik kogus mulda. Mulla ja kütuse segu segati hoolikalt steriilse metallist spaatliga.

Tabel 3. Katses testitud variandid, kütuse kontsentratsioonid ja kasutatud DNA eralduskitid.

Katsevariant	IFO 180 konts.	DNA eralduskomplekt	Eralduste arv
1. Muld (kontroll)	0%	Mullakit	3
		Biokile kit	
2. Muld IFO 1	1%	Mullakit	3
		Biokile kit	
3. Muld IFO 5	5%	Mullakit	3
		Biokile kit	
4. Muld IFO 10	10%	Mullakit	3
		Biokile kit	

2.2 DNA ERALDAMINE JA KVANTIFITSEERIMINE

DNA eraldusteks kasutati biokile-spetsiifilist Dneasy PowerBiofilm Kit'i (Qiagen) ja mullaspetsiifilist PowerSoil DNA Isolation Kit'i (Qiagen). Eraldamisel lähtuti tootja protokollist. Erinevalt standardsest protokollist teostati homogeniseerimisetapp 5000 pööret minutis 20 sekundi jooksul homogenisaatoril Precellys 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa). DNA saagise suurendamiseks pesti DNA filtrilt välja kahes etapis lisades esmalt 60 μl C6 lahust filtrile ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 30 sekundit 10,000 x g juures ning seejärel lisati 40 μl C6 lahust ning tsentrifuugiti taas 30 sekundit 10,000 x g juures. Eraldatud DNA

kontsentratsiooni määramiseks kasutati spektrofotomeetrit Infinite 200 M (Tecan AG, Männendorf, Šveits) ning andmeid töödeldi programmiga i-control™. Eraldatud DNA säilitati sügavkülmikus -20 °C juures.

2.3 BAKTERITE 16S rRNA GEENI KVANTIFITSEERIMINE

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) abil määrati proovides bakterite 16S rRNA geeni arvukus. Selleks kasutati praimeripaari Bact517F (5'-GCCAGCAGCCGCGGTAA-3', Lin *et al.*, 2007) ja Bact1028R (5'-CGACARCCATGCASCACCT-3', Dethlefsen *et al.*, 2008). Fragmendi pikkuseks oli 530 aluspaari. Kõik qPCR reaktsioonid viidi läbi RotorGene Q (Qiagen) masinas, rakendades RotorGene Series tarkvaraversioon 2.0.2 (Qiagen) tarkvara. Reaktsioonisegu, mille lõppmaht oli 10 µl, sisaldas 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, Waltham, USA), 0.2 µl (0,6 µM) mõlemat praimerit, 1 µl eraldatud DNAd ja ülejäänud mahus (3,6 µl) steriliseeritud destilleeritud vett. Kasutasin järgmist qPCR programmi: denaturatsioon 95 °C 10 min, 35 tsüklit: denaturatsioon 95 °C 30 s, praimerite hübridiseerimine 60 °C, 45 s, produkti süntees 72 °C 45 s.

Kõik proovid amplifitseeriti kolmes korduses ja igale mõõtmisele lisati negatiivne kontroll, mis sisaldas kõiki reaktsioonisegu komponente peale proovi DNA. Pärast qPCR amplifikatsioonireaktsiooni määrati sulamiskõver vahemikus 70 °C kuni 90 °C (0,35 °C/3 s) pideva fluorestsentssignaali mõõtmisega.

Saadud tulemuste kvaliteeti analüüsiti RotorGene Software version 2.0.2 tarkvaraga. Hinnati sulamiskõverate paiknemist ja kuju ning amplifikatsioonikõverate ühtsust. Hälbivate amplifikatsiooni- ja sulamiskõveratega proovid elimineeriti edasisest analüüsist. Proovide amplifikatsiooniefektiivsust hinnati programmi LinRegPCR v. 2016.1 abil (Ruiet *al.er et al.*, 2009).

16S rRNA geeni arvukuse leidmiseks kasutati kvantifitseerimisstandardit, mille loomises antud töö autor ei osalenud. Proovidest bakterite 16S rRNA geenide koopiaarvude määramiseks kasutati standardi vahemikku $1 \cdot 10^8$ kuni $1 \cdot 10^6$ geenikoopiat reaktsioonis, mis näitas parimat kattuvust proovide Ct väärtustega. 16S rRNA geeni kvantifitseerimiseks leiti märklaudgeeni kontsentratsiooni (A) ja standardipunktide (B) vaheline kordusaste vastavalt järgnevale valemile (Ruiet *al.er et al.*, 2009).

$$\text{Kordsusaste} = N_{0,A}/N_{0,B} = (N_{t,A}/E_{ACt,A})/(N_{t,B}/E_{BCt,B}),$$

kus:

$N_{0,A}$ – märklaudgeeni kontsentratsioon proovis fluorestsentsiühikutes

$N_{0,B}$ – märklaudgeeni järjestuse kontsentratsioon standardlahjenduses

E – amplifikatsiooni efektiivsus

N_t – fluorestsentsi läviväärtus

C_t – läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv

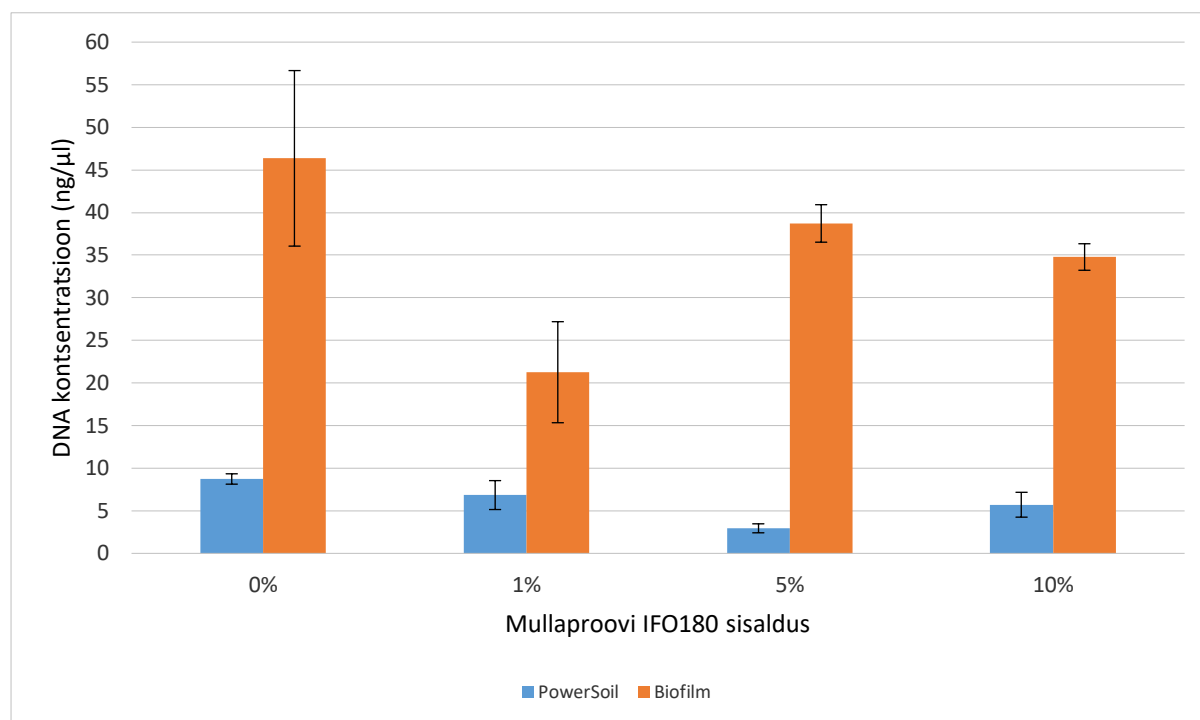
Bakteriaalse 16S rRNA geeni arvukuse leidmiseks korrutati saadud kordsusaste vastava standardlahjenduse kontsentratsiooniga. Uuritava geeni lõplik arvukus proovis leiti kvantifitseerimisstandardi erinevate punktide alusel saadud koopiaarvude ja proovide paralleelide aritmeetilisel keskmistamisel.

2.4 ANDMETE ANALÜÜS

Statistiliseks analüüsiks kasutati kahe faktoriga dispersioonanalüüsi (ANOVA), et võrrelda kõikide töotluste tulemusi. 16S rRNA geeni arvukuse puhul tehti analüüs logaritmitud andmetega. Analüüsiks kasutati logaritmitud andmeid, kuna tavaliselt pole bakterite arvukuse väärtused normaaljaotusega.

3. TULEMUSED

3.1 DNA KONTSESTRATSIOONIDE ERINEVUSED



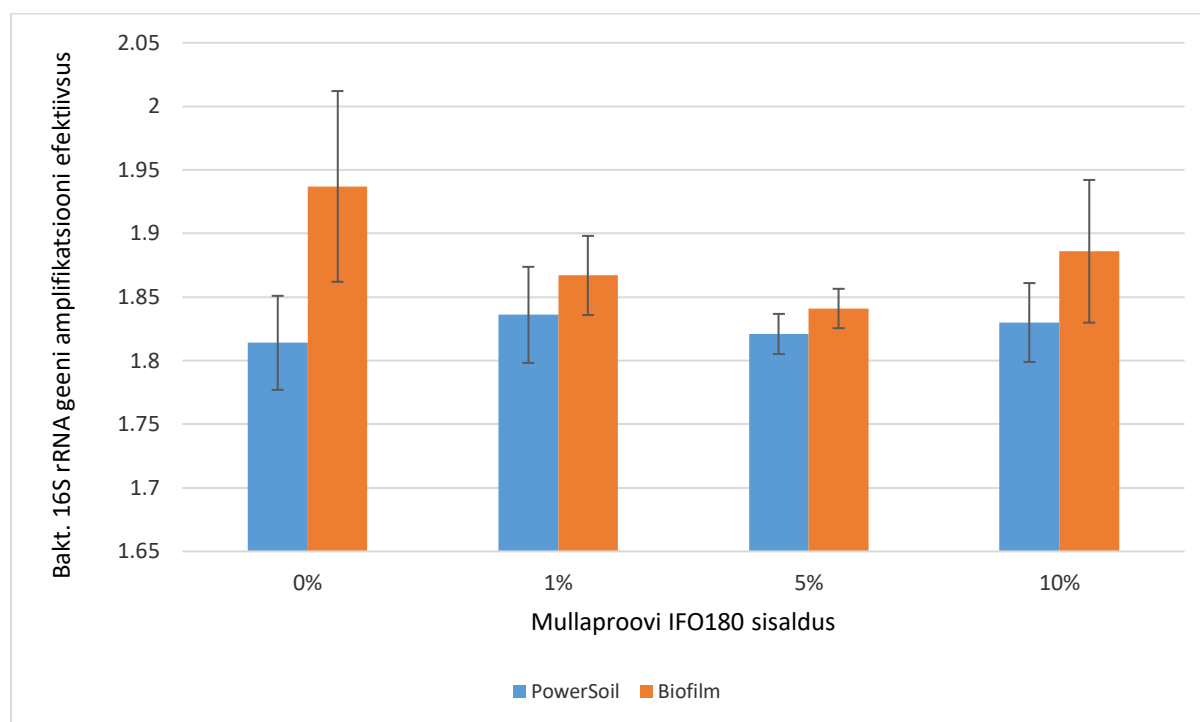
Joonis 5. Kahe erineva eraldusmeetodiga saadud keskmised DNA kontsentratsioonid erineva kütuse IFO180 kontsentratsioonidega mullaproovides. Joonisel on näidatud iga variandi keskväärtsus ja standardhälve.

Kõige kõrgem DNA kontsentratsioon (ng/μl) mõõdeti Biofilm kit'iga eraldades ilma kütuseta mullaproovis, seejärel 5%, 10% ja 1% kütuse sisaldusega mullaproovides (joonis 5). Iga töötuse puhul on selgelt näha, et biokile-spetsiifilise Biofilm eralduskomplektiga oli DNA kontsentratsioon kordades suurem. ANOVA analüüs näitas, et kit'i mõju on statistiliselt oluline ($p < 0.0001$). Statistiliselt oluline oli ka lisatud IFO180 koguse mõju ($p < 0.001$). Maksimaalne DNA saagis oli Biofilm kit'i puhul 46 ng/μl, ning PowerSoil kit'iga 8 ng/μl. Mõlema kit'i maksimumid esinesid mullaproovis, millele IFO180 ei olnud lisatud. Seega statistiliselt oluline oli ka kit'i ning lisatud IFO180 koguse koosmõju ($p < 0.01$). Kõige madalam DNA kontsentratsioon Biofilm kit'iga esines 1% IFO180 sisaldusega mullaproovis ning PowerSoil kit'iga 5% IFO180 kontsentratsiooniga mullaproovis.

Üksnes nende numbrite põhjal on aga raske öelda, kas need DNA kogused on piisavad või mitte. Sager *et al.* (2014) katsetasid viit erinevat meetodit, mis põhinesid mittespetsiifilistel

kommertsiaalsetel eralduskomplektidel. Mullaproovidest DNA kvantifitseerimiseks kasutati fluorestsentspektrofotomeetriat ning fluorestsentsvärviks SYBRgreen'i. Õhkkuiva mulla kogus oli eksperimendis 750 mg, millest saadi DNA kontsentratsioone vahemikus 3.0...36.0 ng/μl. Need kogused olid üsnagi sarnased antud töös saadud DNA kontsentratsioonidele – alumine piir oli PowerSoil'iga saadud 2.5 ng/μl ja ülemine 46 ng/μl Biofilm kit'iga.

3.2 BAKTERI 16S rRNA AMPLIFIKATSIOONI EFEKTIIVSUS

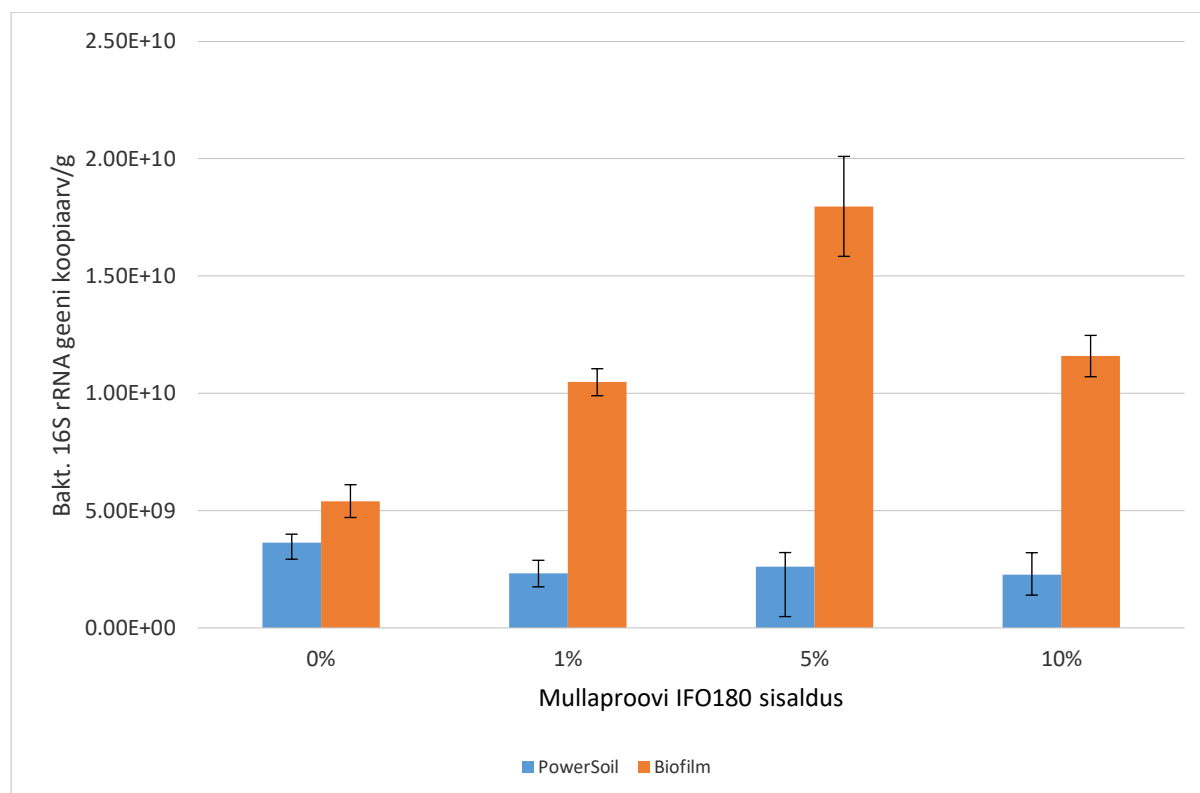


Joonis 6. Keskmised polümeraasahelreaktsiooni amplifikatsiooni efektiivsused kahe erineva eraldusmeetodiga saadud DNA ja IFO180 kontsentratsioonidega mullaproovides. Joonisel on näidatud iga variandi keskväärtus ja standardhälve.

Võrreldes DNA kontsentratsioonidega on amplifikatsiooni efektiivsuste erinevused kahe eralduskomplekti vahel väiksemad. Kõige suurem amplifikatsiooni efektiivsus esines Biofilm kit'iga ilma kütuseta mullaproovis, ning väikseim sama töötuse eralduses PowerSoil kit'iga (joonis 6). PowerSoil kit'i amplifikatsiooni efektiivsuste väärtused olid vahemikus 1.84...1.94, ning Biofilm kit'iga 1.81...1.84. Seega ei esinenud kummagi kit'iga nii suurt kõikumist, kuigi kit'i mõju oli statistiliselt oluline ($p < 0.0001$). Kui Biofilm töötluste 0%, 1% ja 5% efektiivsused järjest kahanesid, siis 10% IFO180 sisaldusega mullaproovi amplifikatsiooni efektiivsus oli märgatavalt kõrgem väiksemate IFO võrreldes. PowerSoil kit'iga saadud amplifikatsiooni

efektiivsuse ning IFO180 kontsentratsioonide vahel ei paistnud olevat korrelatsiooni - kõige kõrgemad efektiivsused esinesid 1% ja 10% töötluste puhul ja kõige väiksemad 0% ning 5% töötluste eraldustes. Lisatud IFO180 kogusel statistiliselt olulist mõju efektiivsusele ei esinenud.

3.3 BAKTERITE 16S rRNA GEENI ARVUKUS



Joonis 7. Keskmised bakteri16S rRNA geeni arvukused kahe erineva eraldusmeetodiga saadud DNA ja IFO180 kontsentratsioonidega mullaproovides. Joonisel on näidatud iga variandi keskvärtus ja standardhälve.

Kõrgeim bakterite 16S rRNA geeni arvukus (koopiarv/g) esines Biofilm komplektiga eraldatud 5% IFO180 sisaldusega mullaproovis (joonis 7). Sarnaselt eelmistele parameetritele oli kõige madalam arvukus PowerSoil kit'iga eraldades 10% IFO 180 sisaldusega mullaproovist. Kui PowerSoil kit'iga eraldatud proovide arvukus kõikis kõikide töötluste puhul suhteliselt väikese vahemiku sees ($2 \cdot 10^9 \dots 3.9 \cdot 10^9$), siis Biofilm'iga eraldatud arvukuste vahemik oli palju laiem - $5.8 \cdot 10^9 \dots 1.8 \cdot 10^{10}$. Statistiliselt oluline on siinkohal kit'i mõju 16S rRNA arvukusele ($p < 0.0001$), kuid mitte IFO180 kogus. Nõrka statistilist olulisust näitas kit'i ja IFO180 kontsentratsiooni koosmõju ($p < 0.05$)

Selleks, et saada aimu ka nende 16S rRNA geeni arvukuste tähendustest ja kvaliteedist tuleb heita pilk kirjandusse. Saksamaalt, Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt laborist pärit liivsavist (tüüp 2.3) eraldati PowerSoil komplektiga keskmiselt $6.38 \cdot 10^6$ koopiat/g (Wagner *et al.*, 2015). Need on suhteliselt madalad väärtused kui arvestada joonisel 7 näidatud Biofilm komplekti puhul saadud 16S rRNA geeni arvukust. Eesti rohumaa mullast eraldatud 16S rRNA geeni koopiaarv on olnud vahemikus $8.63 \cdot 10^7 \dots 1.67 \cdot 10^8$ (Nõlvak jt, 2016) ja põllumuldadest eraldatud 16S rRNA geeni koopiaarv vahemikus $4.55 \dots 6.12 \cdot 10^9$ (Nõlvak jt, 2016; Truu jt, 2017).

DNA kontsentratsioon, bakteri 16S rRNA geeni amplifikatsiooni efektiivsus ja 16S rRNA geeni arvukus olid kõige kõrgemad Biofilm kit'i kasutades. Vastavalt nendele tulemustele on selle eralduskomplekti kasutamine sobilikuim mullaproovidest DNA eraldamiseks. Merekeskkondade biokilede bakteriaalse mitmekesisuse uuringud on samamoodi näidanud, et Biofilm kit'i kasutamine annab kõige suuremaid DNA koguseid (Corcoll *et al.*, 2017).

KOKKUVÕTE

Lähitulevikus ei vabane maailm täielikult naftasaaduste kasutamisest ja kuigi laevaõnnetuste hulk pidevalt langeb, on naftalekete juhtumine meretranspordi käigus paratamatu. Õnnetuste poolt tekitatud loodusliku ja majandusliku kahju vähendamiseks on välja töötatud hulgaliselt füüsikalisi, keemilisi ja bioloogilisi meetodeid, mis teadlikul kombineerimisel suudavad pea täielikult naftareostuse keskkonnast likvideerida. Lõpliku reostuse eemaldamise meetodi valimine sõltub naftast ja naftareostuse kogusest, saastatud pinnasest, endemsest elustikust, ala ligipääsetavusest, ning meetodi intrusiivsusest ja majanduslikust kulust. Mikroorganismid, kes suudavad naftasaadusi lagundada elavad kõikides merekeskkondades - ka külmas, kõrge rõhu ja väheste toitainetega ookeani kihtides. Biolagundamist piiravateks teguriteks on tavaliselt hapnik ja teiste toitainete (P, N) kontsentratsioonid. Teades reostunud keskkonna ja mikroobikoosluse eripärasid suudetakse stimuleerida biolagunemise kiirust, kas toitainete või mikroorganismidega, sealjuures vältides keskkonnale lisakahju tegemist.

Antud töö eksperimentaalse osa tulemuste põhjal saab teha järelduse, et laevakütusega saastunud keskkonnaproovidest DNA eraldamiseks on sobiv kasutada biokile-spetsiifilist Dneasy PowerBiofilm Kit põhinevat meetodit. Selle meetodi puhul on suurem DNA saagis ja kõrgem 16S rRNA geeni amplifikatsiooni efektiivsus kui PowerSoil DNA Isolation Kit kasutades. Dneasy PowerBiofilm Kit puhul olid suuremad ka hinnangud bakterite 16S rRNA geeni arvukuse osas. Käesoleva töö tulemusi saab kasutada Horisont 2020 projekti GRACE raames Gröönimaal 2017 aastal läbiviidud nafta biolagunemiskatse proovidest DNA eraldamiseks.

Impacts of oil spills on shorelines and cleanup methods

Christof Uisk

Summary

Oil spills are an inevitable consequence of a world dependent on fossil fuels. The increase in exploitation, production and transportation of marine oil in Arctic environments lead to additional risks of oil spill contamination. Although crude oils has been a part of marine environments for millions of years, natural sources release hydrocarbons into the environment at a slow rate, allowing surrounding organisms to adapt to the nutrient flow. Large, sudden increases in hydrocarbon concentrations, such as oil spills, have a detrimental effect on the surrounding ecosystems. Immediately after an oil spill, physical and chemical forces begin to change the composition of the oil slicks. Depending on the type of oil, several processes, such as evaporation, spreading and dispersion, decrease the oil concentration and produce more soluble compounds. The development of physical, chemical and biological methods have made it possible to remove large amounts of the spilled oil from seas and shorelines. Biological methods, such as biostimulation and bioaugmentation, are environmentally friendly and economically sound alternatives to industrial cleanup methods. As bioremediation is carried out by microorganisms, several environmental factors affect the speed and rate at which the process is carried out. Amongst the most important factors are temperature, oil concentration and the availability of nutrients and oxygen. The effectiveness of bioremediation techniques depends on the unique characteristics of the spill site, therefore sufficient information must be gathered before this method can be used to its full extent.

Based on the experimental results of this study, it was found that for the purpose of extracting DNA from oil-contaminated soil samples, the Dneasy PowerBiofilm Kit is more suitable than the PowerSoil DNA Isolation Kit. The method yielded higher DNA concentrations, 16S rRNA gene amplification efficiency and abundance of the bacterial 16S rRNA gene. The results of this study will be used to extract DNA from field bioremediation experiment samples gathered in Greenland for the Horizon 2020 project GRACE.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Abed, RMM, Al-Kharusi, S., Prigent, S., Headley, T. *Diversity, Distribution and Hydrocarbon Biodegradation Capabilities of Microbial Communities in Oil-Contaminated Cyanobacterial Mats from a Constructed Wetland*. PLoS ONE 9(12) (2014).
2. Adams, O., G., Fufeyin, T., P., Okoro, E., S., ja Ehinomen, I. *Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review*. International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation, Vol. 3, 1 (2015).
3. Atlas, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological Reviews, Vol. 45, 1 (1981): 180-209.
4. Bayat, A., Moheb, S. F. A. A., Vakili-Nezhaad, G. R. *Oil Spill Cleanup from Sea Water by Sorbent Materials*. Chem. Eng. Technol., 28, No. 12 (2005). doi: 10.1002/ceat.200407083.
5. Beyer, J., Trannum, H. C., Bakke, T., Hodson P. V., Collier, T. K. *Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review*. Marine Pollution Bulletin (2016).
6. Beilen, J. B. van, Funhoff, E. G. *Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation*. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2008): 13-21. doi:10.1007/s00253-006-0748-0
7. Carls, G. M., Rice D. S., Hose, E. J. *Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage and mortality in larval Pacific herring (Clupea pallasii)*. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 18, 3 (1999): 481-493.
8. Clayton, Jr., J. U.S. Environmental Protection Agency – Risk Reduction Engineering Laboratory (1993). Chemical Shoreline Cleaning Agents for Oil Spills.
9. Corcoll, N., Österlund T., Sinclair, L., Eiler A., Kristiansson, E., Backhaus, T., Eriksson, K. M. *Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing*. FEMS Microbiology Letters, Vol. 364, No. 14 (2017).
10. Ghannam, M. T., Chaalal, O. *Oil spill cleanup using vacuum technique*. Fuel 82 (2003) 789-797.
11. Guibert, L., Borglin, S. E., Lozada, M., Dionisi, H. *Diverse Bacterial Groups Contribute to the Alkane Degradation Potential of Chronically Polluted Subantarctic Coastal Sediments*. J. of Microb. Ecol. (2015). doi: 10.1007/s00248-015-0698-0.
12. Gundlach, E. R., Hayes, M. O. *Vulnerability of Coastal Environments to Oil Spill Impacts*. Marine Technology Society Journal, Vol. 12, 4 (1978).

13. Hazen, C., T., Prince, C., R., Mahmoudi, N. *Marine Oil Biodegradation. Environ. Sci. Technol.* (2016): 2121-2129. doi:10.1021/acs.est.5b03333.
14. Hellat, K., Orupõld, K., Tuvikene, A., Kreitsberg, R., Laht, M., Pedusaar, T., Kahn, H. *Keskkonnatoksikoloogia alused.* (2012).
15. Heintz, A. R. *Chronice Exposure to Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Natal Habitats Lead to Decreased Equilibrium Size, Growth and Stability of Pink Salmon Populations.* Integrated Environ. Assessment and Management, Vol. 3, 3 (2006): 351-363.
16. International Association of Oil & Gas Producers. *Impacts of oil spills on shorelines – good practice guidelines for incident management and emergency response personnel.* (2016).
17. Koshlaf, E., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Taha, M. Haleyr, N., Makadia, T. A., Morrison, P. D., Ball, A. S. *Bioremediation potential of diesel-contaminated Libyan soil.* Ecotoxicol. Saf. 133 (2016): 297-305.
18. Kriipsalu, M., Maastik, A., Truu, J. *Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamise.* (2016). Tallinn: TTÜ. ISBN 978-9949-23-847-7.
19. Łebkowska, M., Zborowska, E., Karwowska, E., Mias'kiewicz-Peńska E., Muszyn'ska, M., Tabernacka, A., Naumczyk, J., Jeżalik, M. *Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland.* Ecol. Eng. 37 (2011): 1895-1900.
20. National Research Council (US): Committee on the Effects of the Deepwater Horizon Mississippi Canyon-252 Oil Spill on Ecosystem Services in the Gulf of Mexico. *An Ecosystem Services Approach to Assessing the Impacts of the Deepwater Horizon Oil Spill in the Gulf of Mexico.* National Academies Press, Washington, D.C. (2003). ISBN-10:0-309-28845-2.
21. National Research Council (US) Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects. *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects.* National Academies Press (US) (2013). ISBN 0-309-08438-5.
22. National Oceanic & Atmospheric Administration (NOAA) – Hazardous Materials Response & Assessment Division. *Shoreline Countermeasures Manual – Alaska.* (1994)
23. Nõlvak, H., Truu, J., Kriipsalu, M., Kurnasov, A. *Seiratava loodusliku tervenemise rakendamise saneerimismeetodina.* Keskkonnatehnika 7 (2007). ISSN: 1406-0507.
24. Nõlvak, H. *Influence of qPCR workflow on target gene enumeration from environmental samples in the case of bioremediation potential estimation.* University of Tartu Press (2012).

25. Nölvak, H., Truu, M., Kanger, K., Tampere, M., Espenberg, M., Loit, E., Raave, H., Truu, J. *Inorganic and organic fertilizers impact the abundance and proportion of antibiotic resistance and integron-integrase genes in agricultural grassland soil*. Science of the Total Environment, Vol. 562 (2016): 678-689.
26. Olason, E., Bouillon, S., Rampal, P. *Sea ice model developments in view of oil spill forecasting*. (2016)
27. Prince, C., R., Clark, R., J. *Bioremediation of marine oil spills*. Studies in Surface Science and Catalysis vol. 151 (2004): 18. peatükk
28. Radwan, S. S. *Microbiology of Oil- Contaminated Desert Soils and Coastal Areas in the Arabian Gulf Region, Microbiology of Extreme Soils*. Soil Biology ed., Dion and Nautiyal CS, Berlin (2008): 275-298.
29. Sagar, K., Singh, S. P., Goutam, K. K., Konwar, B. K. *Assessment of five DNA extraction methods and a rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction*. Journal of Microbiological Methods (2014): 68-73.
30. Sheppard, P.J., Adetutu, E.M., Makadia, T.H., Ball, A.S., 2011. Microbial community and ecotoxicity analysis of bioremediated, weathered hydrocarbon contaminated soil. Soil Research, Vol. 49 (3), (2011): 261–269.
31. Simpanen, S., Dahld, M., Gerlach, M., Mikkonen, A., Malk, V., Mikola, J., Romantschuk, M. *Biostimulation proved to be the most efficient method in the cimparison of in situ soil remediation treatments after a simulated oil spill accident*. Environmental Science Pollution Research vol. 23, issue 24 (2016).
32. Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C., Ciani, M. *Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community*. International Biodeterioration & Biodegradation 66 (2012): 39-46.
33. The International Tanker Owners Pollution Federation Limited. *Fate of Marine Oil Spills (Technical Information Paper 2)*. (2014a).
34. The International Tanker Owners Pollution Federation Limited. *Cleanup of Oil From Shorelines (Technical Information Paper 7)*. (2014b)
35. Truu, M., Ostonen, I., Preem, J., Lõhmus, K., Nölvak, H., Ligi, T., Rosenvald, K., Parts, K., Kupper, P., Truu, J. *Elevated Air Humidity Changes Soil Bacterial Community Structure in the Silver Birch Stand*. Frontiers in Microbiology, Vol. 8 (2017).

36. Venosa, A. D., Zhu, X. *Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands*. Spill Science and Technology Bulletin, Vol. 8, 2 (2003): 163-178.
37. Wagner, A. O., Praeg, N., Reitschuler, C., Illmer, P. *Effect of DNA extraction procedure, repeated extraction and ethidium monoazide (EMA)/propidium monoazide (PMA) treatment on overall DNA yield and impact on microbial fingerprints for bacteria, fungi and archaea in a reference soil*. Applied Soil Ecology 93 (2015) 56-64.
38. Wrenn, B. A., Haines, J. R., Venosa, A. D., Kadkhodayan, M., Suidan, M. T. *Effects of nitrogen source on crude oil biodegradation*. Journal of Industrial Microbiology, 13 (1994): 279-286.
39. Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., Chen, L. *Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil*. International Biodeterioration & Biodegradation 107 (2016): 158-164.
40. Yang, S. Z., Jin, H. J., Wei, Z., He, R. X., Ji, Y. J., Li., X. M. and Yu, S. P. *Bioremediation of oil spills in cold environments: A review*. Pedosphere, Vol. 19, 3 (2009): 371-381
41. Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T., Lee, K. (2001). Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<https://www.statista.com/statistics/271823/daily-global-crude-oil-demand-since-2006/>

<http://unctadstat.unctad.org/wds/ReportFolders/reportFolders.aspx>

<https://www.reuters.com/article/us-china-shipping-accident/black-smoke-billows-from-tanker-sinking-site-as-worry-grows-over-sea-damage-idUSKBN1F40GV>

http://www.itopf.com/fileadmin/data/Documents/Company_Lit/Oil_Spill_Stats_2016_low_revised_Sep17.pdf

<http://www.itopf.com/knowledge-resources/documents-guides/arctic-cold-climates/>
<https://response.restoration.noaa.gov/oil-and-chemical-spills/significant-incidents/exxon-valdez-oil-spill/high-pressure-hot-water-washing.html>

<http://www.eestiloodus.ee/index.php?artikkel=2383>

<http://www.whoi.edu/oil/ixtoc-I>

LISAD

LISA 1. MEILIVAHETUS MINU JA SOOME KESKKONNAINSTITUUDI REOSTUSELE REAGEERIMISE OSAKONNA JUHI, JORMA RYTKÖNEN'I VAHEL, KUS ON KIRJAS MINU KÜSIMUSED JA TEMA VASTUSED (TÖLGITUD INGLISE KEELEST) (28.03.2018).

- 1. Mille poolest on naftareostuse eemaldamise arktilises kliimas raskem võrreldes soojema kliimaga?**
Naftasaadused käituvad täiesti teistmoodi arktilises kliimas. Põhirõhk on sõnal „murenemine“. Jää takistab peaaegu kõikide likvideerimismeetodite rakendamist, samuti pärsib jää reostuse levikut, kui just ei ole tegu triivjääga. Madalad temperatuurid ja kehv nähtavus teevad likvideerimise raskemaks. Teisest küljest võib jää anda rohkem aega reageerimiseks – triivjää võib reostuse allikast eemale viia, siis saavad naftasaadused sattuda jää sisse lõksu kuni sulamiseni.
- 2. Kuidas Te arvate, et arktilises kliimas naftareostuse toimumise tõenäosus muutub järgmise 10 aasta jooksul?**
Kahtlemata risk tõuseb iga-aastaselt. Juba praegu me näeme, et laevaliiklus pidevalt suureneb, mis tõstab karile sõitmise ja laevade kokkupõrgete tõenäosust. Kahtlemata on jäised tingimused ka üheks ohullikaks.
- 3. Mida Te arvate, et saaks õnnetuste ettevalmiduse tõstmiseks teha?**
Nagu hiline naftareostuse ettevalmiduse harjutus ja arktilise naftareostuse konverents näitas, siis me peame tõstma rahvusvahelise koostöö taset, et edukalt rakendada ettevaatusabinõusid. Me peame läbi viima õppusi, et valmisolekut parandada ning arendama infotehnoloogilisi süsteeme, et olla võimalikult hästi kursis mereliiklusega.

LISA 2. KATSETES MÕÕDETUD PARAMEETRID KOOS STANDARDHÄLVETEGA

	Töötlus	IFO 180 sisaldus	DNA kontsentratsioon(ng/μl)	Bakt. 16S rRNA amplifikatsiooni efektiivsus	Bakt. 16S rRNA koopiarv/g
PowerSoil	1	0%	8,73 ± 0,61	1,814 ± 0,037	3,63E+09
	2	1%	6,84 ± 1,70	1,836 ± 0,038	2,33E+09
	3	5%	2,94 ± 0,53	1,821 ± 0,016	2,61E+09
	4	10%	5,71 ± 1,46	1,830 ± 0,031	2,28E+09
BioFilm	1	0%	46,36 ± 10,30	1,937 ± 0,075	5,41E+09
	2	1%	21,26 ± 5,93	1,867 ± 0,031	1,05E+10
	3	5%	38,72 ± 2,20	1,841 ± 0,015	1,80E+10
	4	10%	34,78 ± 1,56	1,886 ± 0,056	1,16E+10

LIHTLITSENTS

Mina, Christof Uisk (29.09.1994),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Naftareostuse mõju rannikule ja ranniku puhastamise meetodid,“ mille juhendaja on prof. Jaak Truu;
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2018